

THALES RICARDO CIPRIANI

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DE POLISSACARÍDEOS DE *Maytenus ilicifolia*
(ESPINHEIRA-SANTA)**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
(Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica, Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip Albert James
Gorin

CURITIBA

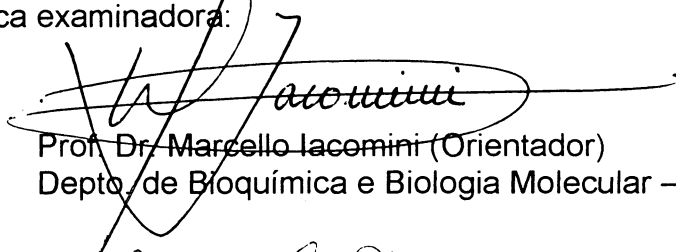
2003

TERMO DE APROVAÇÃO

THALES RICARDO CIPRIANI

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DE *Maytenus ilicifolia* (ESPINHEIRA-SANTA)

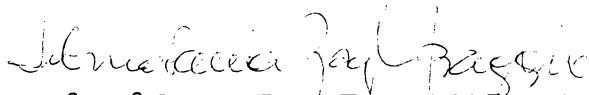
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



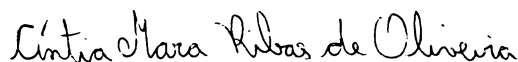
Prof. Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Selma Faria Zawadzki Baggio
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Dr.ª Cíntia Mara Ribas de Oliveira
Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde – UNICENP

Curitiba, 26 de fevereiro de 2003

Dedico este trabalho, com todo amor, aos meus pais, Luiz e Luiza, pelo esforço e dedicação em dar aos seus filhos o mais valioso dos presentes, a educação. Aos meus padrinhos Alírio e Nair, pela grandiosa parcela na minha formação. E, à minha namorada Patrícia, pela paciência, pelas ajudas e pelo amor.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador, Professor Marcello Iacomini, pela oportunidade, confiança e ensinamentos. O seu entusiasmo e a sua empolgação ao falar de carboidratos me trouxeram até aqui.
- Ao meu Co-orientador, Professor Philip A. J. Gorin, pela imensa disposição em solucionar as dúvidas, pelo auxílio nas análises dos resultados, pelas correções do inglês e por seu exemplo de dedicação.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome da Professora Fany Reicher.
- Às Professoras Vânia M. Alcântara (Depto. de Farmácia-UFPR) e Eleidi A. C. Freire-Maia (Depto. de Genética-UFPR), pela minha iniciação científica.
- Aos Senhores Dalnei Serighelli e Mauro Scharnik, da Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná, pela atenção e gentileza no fornecimento da planta *Maytenus ilicifolia* para esta pesquisa.
- Ao Professor Olavo Guimarães (Depto. de Botânica-UFPR), pela identificação da planta.
- Ao Professor Yedo Alquini (Depto. de Botânica-UFPR), pela sua atenção e conselhos.
- À Professora Juliana M. Menestrina, pelas suas dicas para a quantificação dos alditóis.
- Aos Professores Miguel Nosedá, Maria Eugênia R. Duarte, Selma Baggio e Fany Reicher, pelos empréstimos de livros, equipamentos e reagentes.
- Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos meus colegas:

- Andréia, Ildo e Juan. Pelas análises de HPSEC-MALLS e pelo auxílio em interpretá-las.
- Caroline. Pela troca de idéias a respeito de nossas moléculas.
- César. Pelas análises de RMN, bem como pelo auxílio em interpretá-las.

- Cristina e Sandra. Pelos auxílios nas análises de FT-IR.
- Elaine. Muito me ajudou, principalmente a dar os primeiros passos no laboratório de Química de Carboidratos.
- Fernanda. A única que compreendia minha meticulosidade e, desta forma, era a melhor companheira para as análises espectrofotométricas.
- Guilherme. Pelas suas explicações e orientações técnicas.
- Lauro. Pelas análises de GC-MS e pela paciência em rever alguns resultados.
- Renato. Pelos muitos auxílios prestados, pela paciência e por ouvir meus comentários.
- Ricardo. Pelo seu bom humor inabalável e sua sempre boa vontade em ajudar.
- Rodrigo Reis. Pelas caronas e informações políticas.
- Rodrigo Vassoler. Pelas suas assistências técnicas computacionais e por sua boa vontade, mesmo quando desnecessária, em auxiliar minhas diálises.
- Sérgio. Pelas análises de HPLC, explicações e sugestões.
- Adriano, Alan, Ana Helena, Anderson, Andréa, Daniele, Emerson, Fábio, Felipe, Giovana, Hilton, Juliana Curi, Lucimara, Paula, Rafaela, Rosiane, *et al.*

Um agradecimento especial aos criadores do Extrato de Espinheira-Santa “AI MEU SANTO”.

À minha turma-família de mestrado:

- Ana Cláudia, André, André Luís, Daniela, Elaine, Farah, Juliana, Karen, Luiza, Marcelo, Marco, Mariana, Priscila e Ricardo, o meu muito obrigado pela amizade, pelos momentos de descontração e festas, enfim, por esses dois anos inesquecíveis, que tenho certeza, terão continuidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Carboidratos de Plantas.....	2
1.1.1. Parede Celular e Polissacarídeos.....	2
1.1.2. Ramnogalacturonanas tipo I e Arabinogalactanas.....	6
1.1.3. Xilanas.....	10
1.2. <i>Maytenus ilicifolia</i>.....	12
1.2.1. Descrição Botânica.....	12
1.2.2. Estudos Bioquímicos Realizados com a Espinheira-Santa.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Material de Estudo.....	22
3.2. Extração dos Carboidratos (oligo- e polissacarídeos).....	22
3.2.1. Extração com Clorofórmio-Metanol.....	22

3.2.2. Extração com Metanol-Água.....	22
3.2.3. Extração Aquosa.....	23
3.2.4. Extração Alcalina I.....	23
3.2.5. Extração Alcalina II.....	23
3.2.6. Obtenção dos Polissacarídeos do Infuso.....	24
3.3. Purificação dos Polissacarídeos.....	24
3.3.1. Obtenção dos Polissacarídeos Solúveis em Água do Extrato Alcalino I.....	24
3.3.2. Fracionamento dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	25
3.3.3. Fracionamento dos Polissacarídeos pelo Método de Fehling.....	25
3.3.4. Fracionamento dos Polissacarídeos por Coluna de Troca Iônica DEAE-Sephrose “Fast Flow”.....	25
3.4. Análise Estrutural dos Polissacarídeos Isolados.....	25
3.4.1. Composição em Monossacarídeos.....	25
3.4.1.1. Hidrólise ácida total.....	25
3.4.1.2. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida.....	26
3.4.1.3. Determinação dos alditóis livres presentes nas frações EMA e SEEA (Extrato Metanol-Aquoso e Sobrenadante Etanólico da Extração Aquosa).....	26
3.4.2. Metilação dos Polissacarídeos e Análise na Forma de Acetatos de Alditóis.....	26
3.4.3. Hidrólise Ácida Parcial.....	27
3.4.4. Hidrólise Ácida Parcial para Obtenção de Oligossacarídeos Ácidos.....	28
3.4.5. Hidrólise Ácida dos Oligossacarídeos Ácidos.....	28
3.4.6. Carboxi-Redução.....	28
3.5. Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar.....	29
3.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos (HPSEC-MALLS).....	29
3.6. Métodos Analíticos.....	30

3.6.1. Métodos Cromatográficos.....	30
3.6.1.1. Cromatografia em papel.....	30
3.6.1.2. Cromatografia em preparativa papel.....	30
3.6.1.3. Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	31
3.6.1.4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	31
3.6.2. Métodos Espectroscópicos.....	31
3.6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	31
3.6.2.2. Infravermelho.....	32
3.6.3. Métodos Espectrofotométricos.....	32
3.6.4. Métodos Analíticos Gerais.....	33
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 35
4.1. Extração dos Carboidratos.....	36
4.2. Rendimento e Composição Monossacarídica das Extrações.....	37
4.3. Purificação do Polissacarídeo da Fração PBK2.....	39
4.3.1. Análise do Polissacarídeo PK2.....	41
4.3.2. Hidrólise Ácida Parcial de PK2.....	43
4.3.3. Análise de PK2-hp.....	45
4.3.4. Carboxi-Redução de PK2-hp.....	48
4.3.5. Análise de PK2-hpCR.....	49
4.3.6. Análise Comparativa de PK2, PK2-hp e PK2-hpCR.....	52
4.3.7. Obtenção de Oligossacarídeos Ácidos de PK2.....	57
4.4. Purificação e Análise da Fração PBK10.....	60

4.5. Análise do Infuso.....	65
4.6. Análise das Frações EMA e SEEA.....	70
5. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Modelo da parede celular (ALBERSHEIM, 1975).....	5
FIGURA 2 -	Modelo de parede celular primária tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	5
FIGURA 3 -	Estrutura de uma RG I e dos seus principais grupos laterais conhecidos (CARPITA e McCANN, 2000).....	8
FIGURA 4 -	Estrutura das arabinogalactanas tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	9
FIGURA 5 -	Estrutura das arabinogalactanas tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	9
FIGURA 6 -	Principais cadeias laterais substituintes das xilanas (JOSELEAU <i>et al.</i> , 1992).....	11
FIGURA 7 -	<i>Maytenus ilicifolia</i> (folhas e frutos).....	13
FIGURA 8 -	Illicifolinosídeos A, B e C, isolados das folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> (ZHU <i>et al.</i> , 1998).....	15
FIGURA 9 -	Flavonóide tetra-glicosilado isolado das folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> : Kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE <i>et al.</i> , 2001).....	16
FIGURA 10 -	Flavonóides glicosilados, isolados das folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> : (1) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O-[L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo, (2) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-galactopiranosídeo, e (3) quercetin-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE <i>et al.</i> , 2001).....	17
FIGURA 11 -	Flavonóides tetra-glicosilados, isolados das folhas de <i>Maytenus aquifolium</i> : (1) quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)]-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo, (2) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE <i>et al.</i> , 2001).....	18
FIGURA 12 -	Fluxograma do processo de extração dos carboidratos das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i>	36

FIGURA 13 - Fluxograma do processo de purificação do polissacarídeo da fração PBK2.....	39
FIGURA 14 - Perfis de eluição de PBK2s (A) contendo três moléculas distintas (1, 2 e 3), e PK2 (B) com uma única molécula (1), em HPSEC-MALLS.....	40
FIGURA 15 - Espectro de RMN- ¹³ C da arabinogalactana (PK2) em D ₂ O, a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m....	41
FIGURA 16 - Perfil de eluição de PK2-hp em HPSEC-MALLS, utilizando apenas o índice de refração (I.R.).....	45
FIGURA 17 - Espectro de RMN- ¹³ C de PK2-hp em D ₂ O, a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	46
FIGURA 18 - Análise de infravermelho de PK2-hp (amostra ácida) e PK2-hpCR (carboxi-reduzida).....	49
FIGURA 19 - Espectro de RMN- ¹³ C de PK2-hpCR em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	51
FIGURA 20 - Espectros de RMN- ¹³ C de PK2 (A), PK2-hp (B) e PK2-hpCR (C). A e B em D ₂ O e C em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	53
FIGURA 21 - Esquema da provável estrutura da RGI ramificada por cadeias de arabinogalactana.....	56
FIGURA 22 - Esquema provável da cadeia principal da arabinogalactana, ramificada por cadeias de arabinose, segundo dados de metilação.....	56
FIGURA 23 - Análise por HPLC das frações B (A), C2 nativa (B) e C2 hidrolisada (C).....	58
FIGURA 24 - Fluxograma do processo de purificação do polissacarídeo da fração PBK10.....	60
FIGURA 25 - Espectro de RMN- ¹³ C da β-xilana (PK10) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	62
FIGURA 26 - Espectro de DEPT135 da β-xilana (PK10) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	62
FIGURA 27 - Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC da β-xilana (PK10) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m. C1-H1 (correlação entre C-1 e H-1).....	63

FIGURA 28 - Fluxograma do processo de obtenção dos polissacarídeos do infuso das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i>	67
FIGURA 29 - Perfil de eluição de TCAs contendo quatro moléculas distintas (1, 2, 3 e 4), em HPSEC-MALLS.....	68
FIGURA 30 - Espectro de RMN- ¹³ C de TCAs em D ₂ O, a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	68
FIGURA 31 - Comparação entre os espectros de RMN- ¹³ C de PK2 (A) e TCAs (B). Ambos em D ₂ O, a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.....	69
FIGURA 32 - Cromatografia em papel Whatman 1 das frações EMA e SEEA (amostras brutas e hidrolisadas).....	71
FIGURA 33 - Perfis cromatográficos em GC-MS da quantificação dos alditóis, sem prévia redução, presentes em EMA e SEEA utilizando padrão interno de alitol.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RENDIMENTO, DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS DIVERSAS EXTRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	37
TABELA 2 -	ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DO POLISSACARÍDEO PK2.....	43
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA EM DIFERENTES TEMPOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA ARABINO GALACTANA (PK2) EXTRAÍDA DE FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	44
TABELA 4 -	ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DA ARABINO GALACTANA HIDROLISADA PARCIALMENTE (PK2-hp).....	47
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE PK2, PK2-hp E PK2-hpCR.....	50
TABELA 6 -	ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DA ARABINO GALACTANA HIDROLISADA PARCIALMENTE E CARBOXI-REDUZIDA (PK2-hpCR).....	52
TABELA 7 -	ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DAS FRAÇÕES PK2, PK2-hp E PK2-hpCR, CONSIDERANDO A PRESENÇA DO ÁCIDO GALACTURÔNICO.....	54
TABELA 8 -	TEMPOS DE RETENÇÃO E PORCENTAGENS RELATIVAS DOS CONSTITUINTES OBTIDOS POR HPLC DAS FRAÇÕES B, C2 e C2 hidrolisada.....	59
TABELA 9 -	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO PBK10.....	61
TABELA 10 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EM PPM DE RMN- ¹³ C E ¹ H OBTIDOS DA β -XILANA A PARTIR DO HMQC.....	64
TABELA 11 -	RENDIMENTO, DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TCA _p E TCAs DO INFUSO DAS FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	66

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EMA E SEEA.....	70
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
Ác	Ácido urônico
Ara	Arabinose
CMC	Carbodiimida
Cong/Deg	Congelamento e degelo
CP	Cromatografia em papel
D ₂ O	Água deuterada
Da	Daltons
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com a concentração
EMA	Extrato metanol-aquoso
FT-IR	Infravermelho acoplado a transformada de Fourier
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
GC-MS	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	Glucose
¹ H, ¹³ C HMQC	“Two-dimensional heteronuclear (¹ H, ¹³ C)-multiple-quantum coherence spectroscopy”
Hid.	Hidrolisado
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPSEC-MALLS	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos
I.R.	Índice de refração
Lac	Lactose
<i>m/z</i>	Massa por carga
Man	Manose
Me	Grupamento metil (-CH ₃)
MES	2-[N-morpholine]-ethanosulfonic acid

Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaB ² H ₄	Boroidreto de sódio deuterado
NaN ₃	Azida de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
nd	Não determinado
ppm	Partes por milhão
PBA	Polissacarídeo bruto da extração aquosa
PBK10	Polissacarídeo bruto da extração com KOH 10%
PBK2	Polissacarídeo bruto da extração com KOH 2%
PK10	Polissacarídeo purificado da extração com KOH 10% (xilana)
PK2	Polissacarídeo purificado da extração com KOH 2% (arabinogalactana)
PK2-hp	Arabinogalactana hidrolisada parcialmente
PK2-hpCR	Arabinogalactana hidrolisada parcialmente, carboxi-reduzida
Ppt g/d	Fração insolúvel após congelamento e degelo (precipitado)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rha	Ramnose
RG I	Ramnogalacturonanas do tipo 1
<i>R</i> _{Lac}	Distância de corrida, relativa à lactose.
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
rpm	Rotações por minuto
SEEA	Sobrenadante etanólico da extração aquosa
Sob Feh	Fração solúvel na solução de Fehling (sobrenadante)
Sob g/d	Fração solúvel após congelamento e degelo (sobrenadante)
T.A.	Temperatura ambiente
T.R.	Tempo de retenção
TRIS	Aminometilidenotrimetanol
TCA	Ácido tricloroacético
TCAp	Precipitado em ácido tricloroacético 5%
TCAs	Sobrenadante em ácido tricloroacético 5%

TFA	Ácido trifluoroacético
TNR	Terminal não redutor
Xyl	Xilose

RESUMO

A *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) é uma planta medicinal, encontrada na região Sul do Brasil, usada principalmente para o tratamento de úlcera gástrica. Folhas secas e moídas foram extraídas, sucessivamente com CHCl_3 -MeOH (2:1 v/v), MeOH- H_2O (4:1 v/v), H_2O , KOH 2% e KOH 10%, sob refluxo, com rendimentos de 13, 23, 3,6, 20 e 3,7 g%, respectivamente. Paralelamente, folhas secas e moídas foram submetidas à extração por infusão. O extrato com KOH 2% foi purificado, depois de neutralização e diálise, pelo processo de congelamento e degelo, que resultou em um precipitado. O sobrenadante foi cromatografado usando DEAE-Sephrose "Fast Flow" e o eluato obtido com NaCl 0,1 mol/l (2,3 g%) continha um polissacarídeo com uma massa molar de 87.000 g/mol, composto de arabinose, galactose, ácido galacturônico e ramnose em uma proporção de 69:19,5:6,5:5. Análises de RMN- ^{13}C e metilação do polissacarídeo nativo, hidrolisado parcialmente e carboxi-reduzido sugeriram que este poderia ser uma arabinogalactana contendo uma cadeia principal de β -Galp (1 \rightarrow 4), ramificada com substituintes de Araf em O-6. Estas unidades de Araf ligadas à cadeia principal seriam substituídas em O-5, O-3, O-3,5 e O-2,5. Esta arabinogalactana está provavelmente ligada a alguns O-4 de unidades de Rhap de uma ramnogalacturonana tipo I, formada por repetições do grupo dissacarídico (1 \rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2) α -L-Rhap. O extrato com KOH 10% foi purificado pelos processos de congelamento e degelo e Fehling, gerando uma fração com rendimento de 1,4 g%. Análises de RMN- ^{13}C , ^1H , ^{13}C HMQC e metilação demonstraram que esta fração continha de uma β -xilana linear (1 \rightarrow 4). As folhas da *Maytenus ilicifolia* apresentam também 5,0 g% de galactitol e 0,5 g% de arabinitol, determinados por GC-MS a partir dos extratos metanol-aquoso e aquoso. No infuso das folhas de *Maytenus ilicifolia* foi possível verificar a presença de polissacarídeos, porém diferentes daqueles obtidos com KOH 2% e 10%.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carboidratos de plantas

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD e DEY, 1997). Depois da água, eles são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais, entre outras estruturas. Conseqüentemente, os carboidratos estruturais das plantas formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponível na Terra. Eles são certamente nosso mais importante recurso natural renovável e serão usados cada vez mais como fonte de energia e matéria-prima para processos industriais (REID, 1997).

1.1.1. Parede Celular e Polissacarídeos

Com muito poucas exceções, as células das plantas são envolvidas pela parede celular (REID, 1997). Ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT e WALDRON, 1990).

As paredes de células adjacentes encontram-se numa linha divisória conhecida como lamela média, que confere uma forte aderência célula-célula. As células jovens, que ainda mantêm a capacidade de divisão e alongamento, possuem uma parede celular muito fina, com 0,1 a 1 μm de espessura, chamada parede celular primária. Eventos metabólicos na parede primária são de fundamental importância no processo de expansão celular (REID, 1997).

Quando as células da planta perdem a capacidade de crescimento e divisão, elas podem se diferenciar para células de vários tipos, algumas das quais têm paredes celulares muito espessas. O espessamento é feito pelo depósito da parede secundária entre a parede celular primária e a membrana plasmática da célula. Células com espessamento de parede secundária são muito importantes para conferir rigidez aos tecidos da planta (REID, 1997).

Depois do completo espessamento secundário ocorre a deposição, por toda a parede celular, do polímero fenólico lignina, que confere dureza à planta. Esse processo, chamado de lignificação, é usualmente seguido pela morte celular e pelo desaparecimento do conteúdo citoplasmático (REID, 1997).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando muitos polissacarídeos diferentes, proteínas e substâncias aromáticas. Destes, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais (CARPITA e McCANN, 2000). A composição da parede celular primária das dicotiledôneas é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, muito mais espessa que a parede primária, consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade negligenciável de pectina (DEY *et al.*, 1997).

Os polissacarídeos da parede celular das plantas são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose, com relação às suas formas de extração. As pectinas são extraídas com soluções aquosas contendo substâncias como oxalato de amônio ou EDTA. Estas substâncias facilitam a extração desses polímeros pois quelam o Ca^{2+} ou outros cátions bivalentes de metal presentes entre grupamentos carboxílicos carregados negativamente e que fazem uma ponte de ligação entre moléculas pécticas, chamadas zonas de junção. As hemiceluloses são mais difíceis de remover do material da parede celular, requerendo soluções bastante concentradas de hidróxido de sódio ou potássio. O resíduo após a extração das pectinas e hemiceluloses é rico em celulose (REID, 1997).

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Ramnogalacturonanas I e II, arabinanas, galactanas, arabinogalactanas I e homogalacturonanas são exemplos de polissacarídeos pécticos (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959). São hemiceluloses: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 \rightarrow 3), β -glucanas 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4 ligadas e arabinogalactanas II (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

O grupo de PETER ALBERSHEIM foi o primeiro a propor um modelo para a parede celular primária das plantas, a partir de estudos das interconexões dos componentes macromoleculares, pectinas, hemiceluloses, celulose e proteínas, de culturas de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (TALMADGE *et al.*, 1973; BAUER *et al.*, 1973; KEEGSTRA *et al.*, 1973; REID, 1997).

ALBERSHEIM (1975) descreveu a parede celular das plantas (Figura 1) como sendo composta por fibras de celulose ligadas por três outros polissacarídeos. Muitas moléculas de xiloglucana estariam aderidas à superfície das fibras de celulose por interações do tipo pontes de hidrogênio. Cada molécula de xiloglucana seria ligada a uma cadeia de arabinogalactana, que por sua vez está ligada a uma molécula de ramnogalacturonana. Cada ramnogalacturonana poderia ligar-se a várias arabinogalactanas vindas da mesma ou de outra fibra de celulose. Desse modo, cada fibra de celulose poderia ser conectada por várias cadeias de ramnogalacturonanas. Além disso, glicoproteínas também estariam presentes, ligadas, através de suas unidades de açúcar, às moléculas de ramnogalacturonanas.

Mais recentemente, CARPITA e GIBEAUT (1993) propuseram dois tipos distintos de parede celular primária para angiospermas. As dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas, possuem paredes ricas em pectina e hemicelulose, denominadas paredes tipo I. As paredes primárias das gramíneas, chamadas tipo II, contêm muito pouca pectina e proporcionalmente mais hemicelulose. Na parede celular primária tipo I (Figura 2), microfibrilas de celulose estão entrelaçadas por xiloglucanas e esta estrutura está embutida numa matriz de polissacarídeos pécticos, ácido poligalacturônico e ramnogalacturonana, este último substituído com pequenos grupos laterais de arabinana, galactana e arabinogalactana. Na parede tipo II, as microfibrilas de celulose são entrelaçadas por glucuronoarabinoxilanas e apenas uma pequena quantidade de pectina está presente.

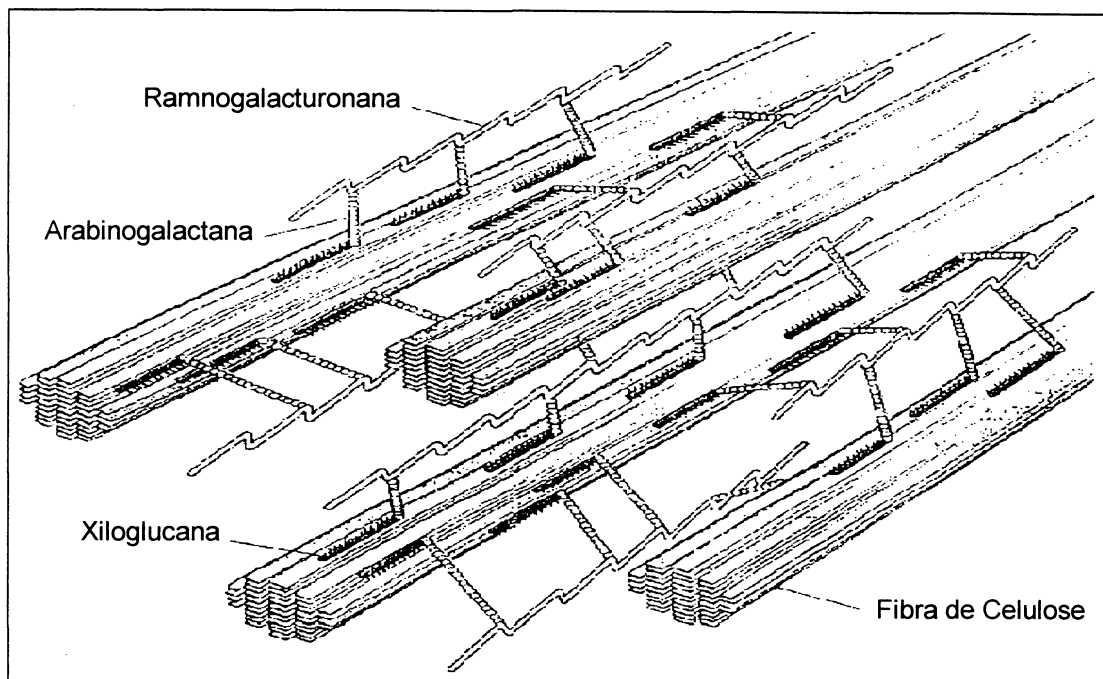


FIGURA 1 – Modelo da parede celular (ALBERSHEIM, 1975).

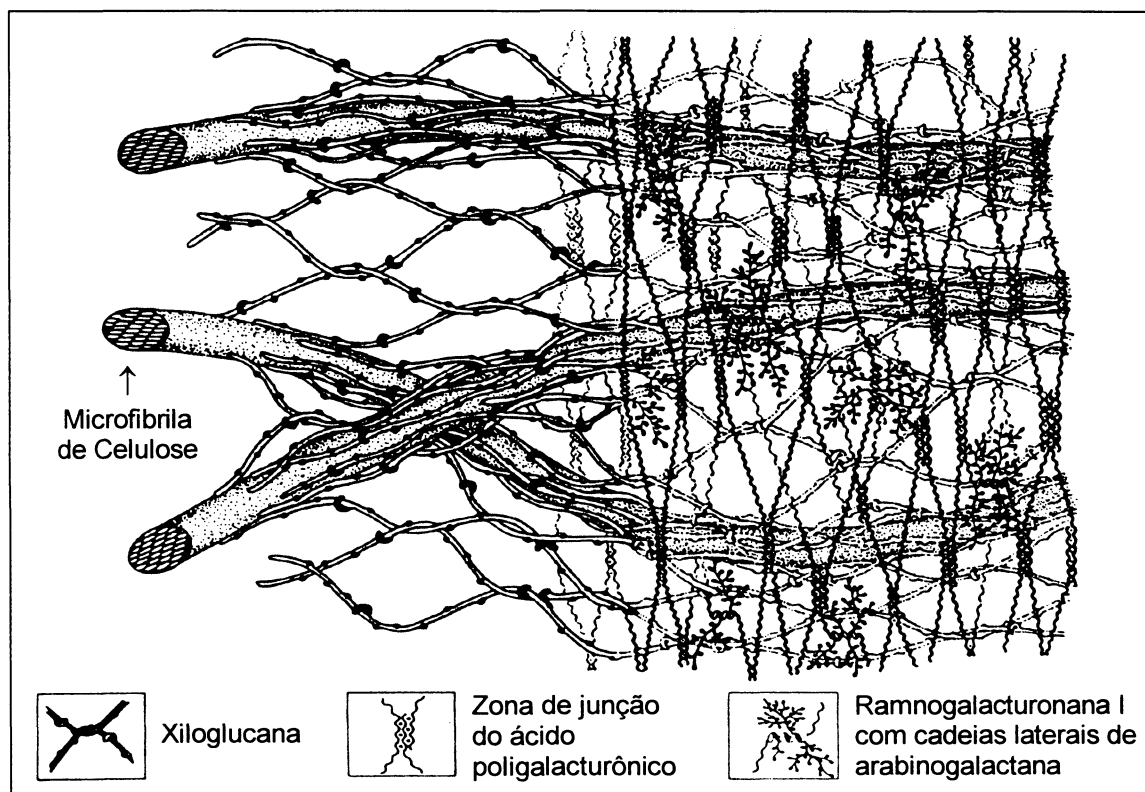


FIGURA 2 – Modelo de parede celular primária tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

1.1.2. Ramnogalacturonanas tipo I e Arabinogalactanas

Ramnogalacturonanas são polissacarídeos pécticos ricos em ramnose (REID, 1997). TALMADGE *et al.* (1973), analisando polissacarídeos pécticos, descreveram uma ramnogalacturonana cuja estrutura era constituída por $(1\rightarrow4)\alpha\text{-GalpA}$ ligado, intercalado por resíduos de $(1\rightarrow2)\alpha\text{-Rhap}$. Segundo eles, a ramnogalacturonana apresentava seqüências constituídas por grupos de $(1\rightarrow4)\alpha\text{-GalpA}$ - $(1\rightarrow2)\alpha\text{-Rhap}$ alternados com segmentos de homogalacturonanas contendo aproximadamente 8 unidades de ácido galacturônico $1\rightarrow4$ ligados. Além disso, aproximadamente metade das unidades de ramnose apresentariam ramificações em seu O-4.

As ramnogalacturonanas I (RG I) são heteropolímeros constituídos por repetições do grupo dissacarídico $(1\rightarrow4)\alpha\text{-D-GalpA}$ - $(1\rightarrow2)\alpha\text{-L-Rhap}$ (McNEIL *et al.*, 1984; LAU *et al.*, 1985; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RG I podem ser estendidas por ácido poligalacturônico em seus terminais e as unidades ramnosil podem também interromper longos períodos de ácido poligalacturônico (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já as ramnogalacturonanas II (RG II) apresentam uma alta diversidade de açúcares, além de ramnose e ácido galacturônico, formando estruturas altamente complexas (CARPITA e GIBEAUT, 1993; REID, 1997).

As unidades de ramnose podem servir como pontos de ramificação da estrutura principal. Conseqüentemente, devido à freqüência variável de unidades de ramnose, existem estruturas mais ramificadas que outras (REID, 1997).

RG I carregam cadeias laterais constituídas principalmente de unidades de açúcares neutros e nem todas as cadeias laterais foram ainda identificadas e caracterizadas totalmente. Ramnogalacturonanas I de diferentes plantas contêm proporções variáveis de polissacarídeos neutros. Baseados em suas altas massas molares, estes componentes devem ser diferenciados das cadeias relativamente curtas de RG I. Acreditava-se que os componentes pécticos neutros eram polissacarídeos distintamente separados (REID, 1997). No entanto, hoje se sabe que, na parede celular, eles são ancorados por polissacarídeos pécticos ácidos constituindo grandes cadeias laterais (Figura 3). Três principais tipos de cadeias laterais de RG I são conhecidas: as arabinanas, as galactanas e as arabinogalactanas (McNEIL *et al.*, 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989).

Por causa de suas complexidades, ramnogalacturonanas apresentam um significativo desafio para químicos de carboidratos, que trabalham por muitos anos para deduzir as seqüências estruturais (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As cadeias laterais das RG I estão fixadas no O-4 das unidades de ramnose (McNEIL *et al.*, 1984). Em geral, quase metade das unidades de ramnose possuem cadeias laterais, mas isto pode variar com o tipo celular e o estado fisiológico. Além disso, um terço das unidades de ácido galacturônico são acetilados na posição O-3 (KOMALAVILAS e MORT, 1989).

Arabinogalactanas são encontradas na maioria das plantas superiores e em muitos de seus exsudatos (FINCHER *et al.*, 1983).

As arabinogalactanas I (Figura 4), encontradas somente em frações pécticas, são compostas por cadeias de (1→4)β-D-galactanas com, na maioria das vezes, unidades de arabinose ligadas no O-3 das galactoses (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já as arabinogalactanas II (Figura 5) constituem um amplo grupo de cadeias curtas de (1→3) e (1→6)β-D-galactanas conectadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. A maior parte das posições O-3 ou O-6 restantes são ocupadas com arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Arabinogalactanas podem estar ligadas a proteínas ricas em hidroxiprolina, e estão possivelmente envolvidas no reconhecimento célula-célula (FINCHER *et al.*, 1983; VARNER e LIN, 1989). Estudos realizados por KOMALAVILAS *et al.* (1991) mostraram que RG II de células de roseira estão ligadas a proteínas.

O uso industrial de polissacarídeos pécticos está baseado nas suas capacidades de geleificação de soluções. São empregados em geléias, estabilizantes e espessantes em molhos, sobremesas, bebidas e suspensões farmacêuticas (SANDFORD e BAIRD, 1983).

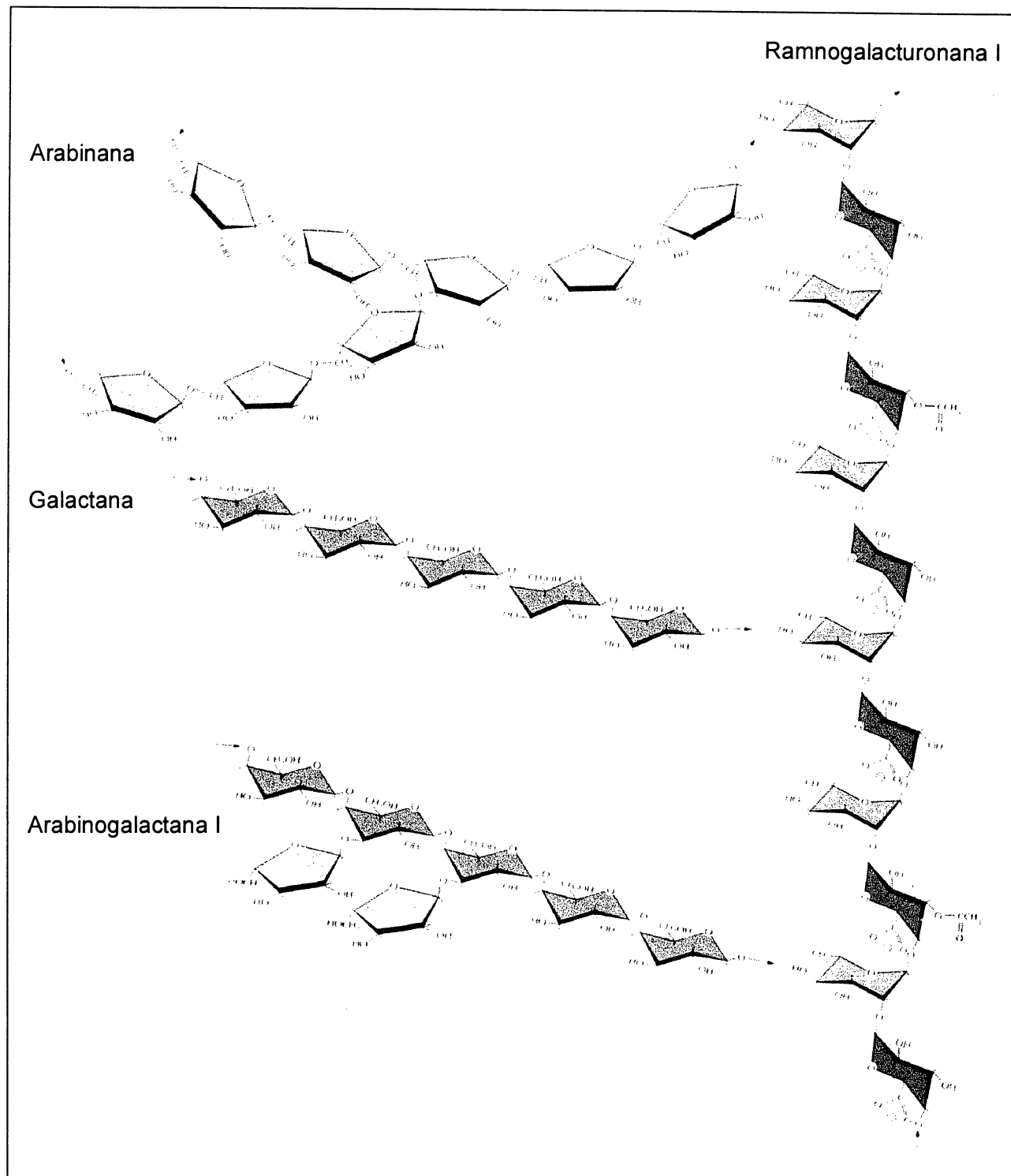


FIGURA 3 – Estrutura de uma RG I e dos seus principais grupos laterais conhecidos (CARPITA e McCANN, 2000).

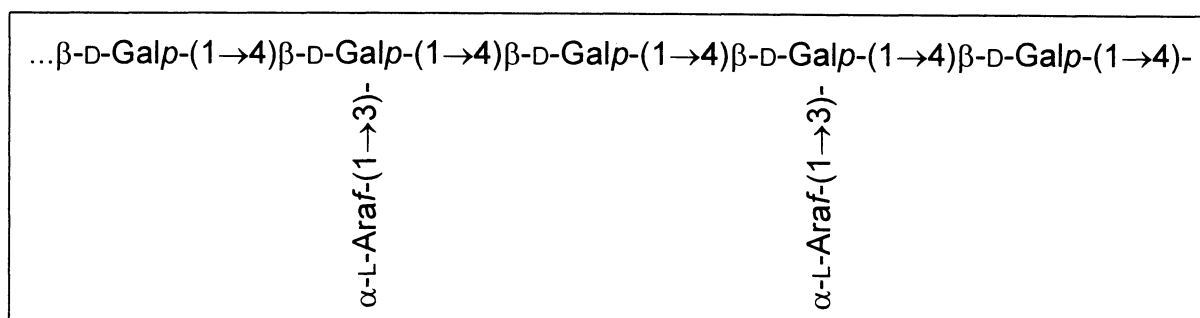


FIGURA 4 – Estrutura das arabinogalactanas tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

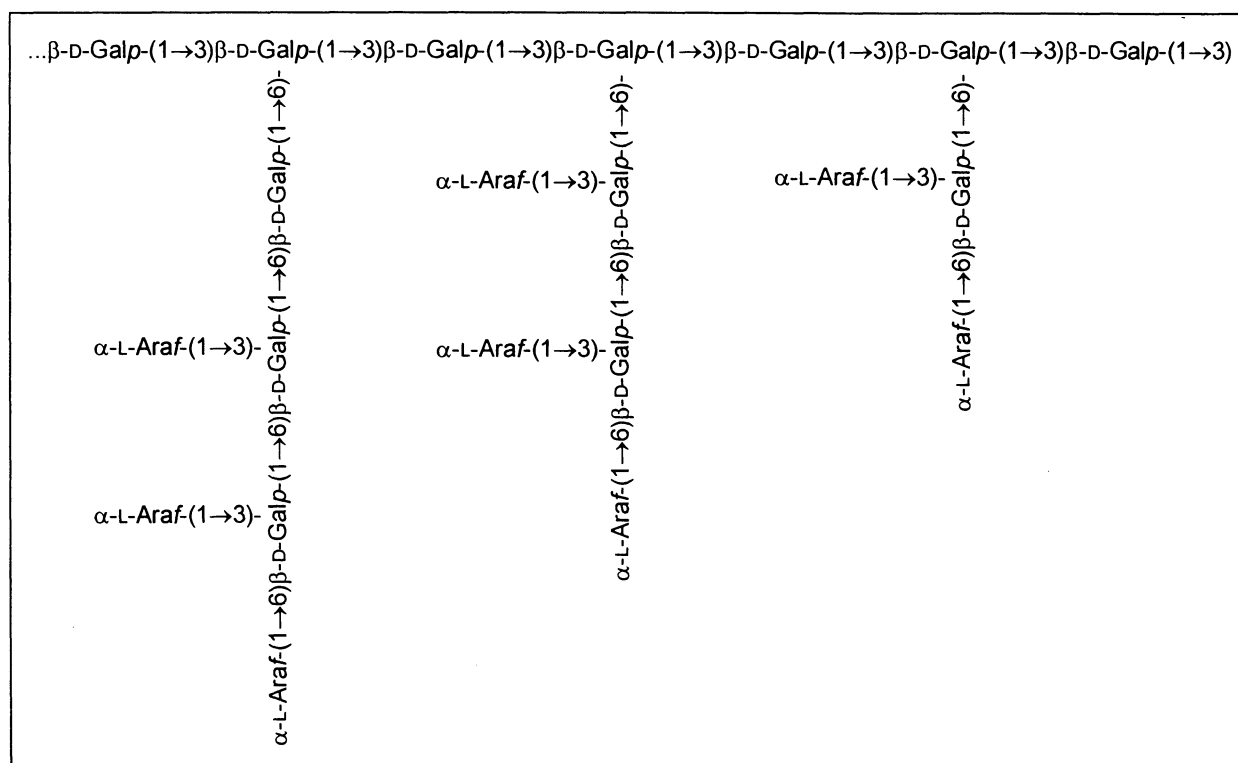


FIGURA 5 – Estrutura das arabinogalactanas tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

1.1.3. Xilanas

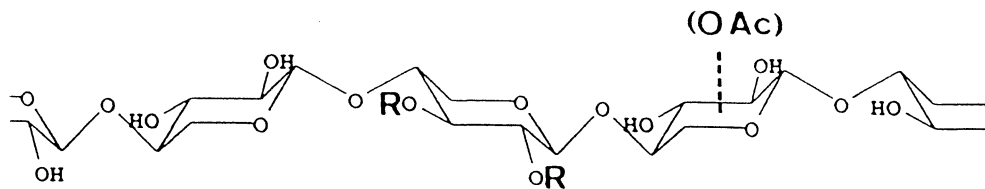
As xilanas são os mais abundantes polissacarídeos não-celulósicos da maioria das angiospermas. Constituem de 20 a 30% do peso seco dessas plantas e são principalmente encontradas nas suas paredes secundárias (ASPINALL, 1980).

As xilanas das plantas terrestres são caracterizadas por uma cadeia principal de (1→4)β-D-xilopiranosose que carrega um número variável de substituintes monossacarídeos neutros ou urônicos, ou oligossacarídeos (Figura 6). Muito poucas xilanas lineares de plantas foram isoladas. Algas marinhas também sintetizam xilanas de diferentes estruturas químicas baseadas numa cadeia principal de (1→3)β-D-xilopiranosose (JOSELEAU *et al.*, 1992).

Uma parte das unidades de ácidos glucurônicos, substituintes de xilanas, estão ligados à lignina por ligação éster (DAS *et al.*, 1981). As xilanas estão também firmemente associadas às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, com uma força de ligação inversamente proporcional ao grau de substituição da cadeia principal (VARNER e LIN, 1989). Elas podem também estar ligadas a proteínas na parede secundária (GREGORY *et al.*, 1998). Devido a estas fortes interações, são necessárias altas concentrações de álcali para a extração das xilanas (CARPITA, 1984; SUN *et al.*, 2001).

Grupamentos O-acetil, geralmente, estão presentes em xilanas, no entanto, o procedimento de extração destes polissacarídeos é de fundamental importância para a manutenção desses grupamentos. Extrações alcalinas removem tais grupamentos, porém o uso de baixas temperaturas e atmosfera de nitrogênio minimizam essa degradação (STEPHEN, 1983). O uso de dimetilsulfóxido (Me₂SO) mostrou-se ideal para a obtenção de xilanas O-acetiladas (BOUVENG, 1961; REICHER *et al.*, 1984; REICHER *et al.*, 1994).

As xilanas são fontes de D-xilose, que pode ser convertida a xilitol, um adoçante alternativo, recomendado para diabéticos e para a prevenção de cárie dental (WINKELHAUSEN e KUSMANOVA, 1998).



R: α -D-GlupA-(1 \rightarrow 2)
 4-O-Me- α -D-GlupA-(1 \rightarrow 2)
 α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)
 α -L-Araf-(1 \rightarrow 2)
 β -D-GalpA-(1 \rightarrow 5) α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)
 β -D-XilpA-(1 \rightarrow 2) α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)
 α -L-Araf-(1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 2,3 Araf)_n-(1 \rightarrow 3)
 Feruloil, cumaroil, lignina
 (OAc): O-acetil

FIGURA 6 – Principais cadeias laterais substituintes das xilanas (JOSELEAU *et al.*, 1992).

1.2. *Maytenus ilicifolia*

A planta *Maytenus ilicifolia* é conhecida popularmente por nomes como cancerosa, coromilho do campo, sombra de touro, espinheira-divina, salva-vidas e, principalmente, por espinheira-santa (CARLINI e BRAZ, 1988). Ela é largamente encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (ZHU *et al.*, 1998). Na medicina popular, o infuso das suas folhas é usado como contraceptivo, diurético, analgésico, anti-séptico, regularizador das funções hepáticas, antibiótico e antineoplásico. Externamente, é utilizado com sucesso em acnes e alguns tipos de eczemas, feridas e ulcerações (UEMG, 2001). Há relatos de que, desde 1922, a espinheira-santa é empregada com resultado positivo contra ulcerações do estômago (CARLINI e BRAZ, 1988; GEOCZE *et al.*, 1988).

1.2.1. Descrição Botânica

Segundo CARVALHO-OKANO (1992), o gênero *Maytenus* é constituído por 225 espécies e está representado, no Brasil, por 77 espécies e 14 variedades, incluindo representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos. *Maytenus ilicifolia* está enquadrada na seção *Oxyphylla*, cuja característica é a presença de espinhos no bordo foliar. É um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo até cinco metros de altura. Os ramos novos são glabros, angulosos, tetra ou multicarenados. As folhas são coriáceas e glabras, o pecíolo de 2 a 5 mm de comprimento, as estípulas inconspícuas, o limbo de 22 a 89 mm de comprimento e de 11 a 30 mm de largura e as nervuras proeminentes na face abaxial. A forma das folhas varia de elíptica a estreitamente elíptica, com base aguda à obtusa e ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; podem ter a margem inteira ou com espinhos, em número variável, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente, concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos.

Maytenus ilicifolia é facilmente distinguível das demais espécies da seção, pelos ramos angulosos tetra ou multicarenados e frutos orbiculares de coloração vermelho-alaranjada. Porém, é freqüentemente confundida com *Maytenus aquifolium*, espécie-tipo da seção, cujo nome comum também é espinheira-santa.

Algumas das características descritas anteriormente podem ser verificadas na Figura 7.



FIGURA 7 – *Maytenus ilicifolia* (folhas e frutos)

1.2.2. Estudos Bioquímicos Realizados com a Espinheira-Santa

Em 1988, no Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, foi publicada uma série de seis trabalhos relatando as propriedades terapêuticas da *Maytenus ilicifolia*, em relação a sua ação antiúlcera gástrica. Os resultados obtidos comprovaram cientificamente a eficácia terapêutica da planta.

MACAUBAS *et al.* (1988), estudando plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de males do estômago, demonstraram que o infuso das folhas de *Maytenus ilicifolia* apresenta um marcante efeito protetor contra úlcera gástrica induzida em ratos. Ambas, *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* possuem tal ação (CARLINI e BRAZ, 1988). Foi verificado que tanto a administração

aguda quanto o uso prolongado do infuso liofilizado, ressuspendido em água, mesmo em doses centenas de vezes maiores do que as ingeridas pelo homem, são completamente atóxicas a ratos e camundongos quando administradas por via oral (OLIVEIRA e CARLINI, 1988; CARLINI *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1991). Além disso, doses correspondendo ao dobro da posologia utilizada comumente na medicina popular (uso popular do infuso = 3 g de planta moída + 150 ml de água fervente) não mostraram toxicidade para o ser humano (CARLINI e FROCHTENGARTEN, 1988). GEOCZE *et al.* (1988) demonstraram a eficácia do infuso liofilizado de *Maytenus ilicifolia* (200 mg) no tratamento da dispepsia não-ulcerosa (síndrome caracterizada por sintomas semelhantes aos da úlcera péptica, mas sem achado endoscópico de lesão ulcerativa ou de refluxo gastro-esofágico). No entanto, em pacientes ulcerosos não foram obtidos resultados concludentes.

Parte desse estudo da ação antiúlcera gástrica da espinheira-santa foi internacionalmente publicado por SOUZA-FORMIGONI *et al.* (1991). Os extratos aquosos quentes (infusos) da *Maytenus ilicifolia* e da *Maytenus aquifolium* causaram um aumento do volume e do pH do suco gástrico de ratos, com efeitos sobre o pH comparáveis à cimetidina. A cimetidina é um antagonista de receptor H_2 que inibe competitivamente a secreção gástrica provocada pela histamina e por outros agonistas de H_2 (GOODMAN e GILMAN, 1996). O efeito protetor dose-dependente foi demonstrado tanto com a administração via oral quanto intraperitonal, o que indica um possível mecanismo sistêmico de ação. Os resultados obtidos tendem a confirmar o uso popular da planta. SOUZA-FORMIGONI *et al.* (1991) também mencionam que extratos liofilizados mostram a mesma atividade antiulcerogênica depois de até 15 meses de estocagem. Dessa forma, os extratos liofilizados apresentam grande estabilidade, o que dá valor ao uso de produtos comerciais da planta.

EZAKI *et al.* (1985), citado por SOUZA-FORMIGONI *et al.* (1991), demonstraram que a atividade antiulcerogênica da *Linderae umbellatae* deve-se à presença de taninos condensados. No entanto, SOUZA-FORMIGONI *et al.* (1991), encontraram apenas 0,2% de taninos entre o total de 19,4% de compostos fenólicos em *Maytenus* e nenhum tanino condensado foi identificado. Assim, estudos futuros são necessários para se identificar os constituintes antiulcerogênicos dessas plantas.

FALEIROS *et al.* (1992) verificaram que frações hexânicas brutas de folhas de *Maytenus ilicifolia*, ricas em hidrocarbonetos e triterpenos, possuem efeito antiulcerogênico semelhante à cimetidina em ratos. Duas substâncias isoladas a partir do extrato aquoso de folhas de *Maytenus ilicifolia*, a 4-O-metil-epigallocatequina e seu epímero 4-O-metil-ent-gallocatequina, inibiram a secreção ácida de forma dose-dependente em mucosas gástricas de rãs (OLIVEIRA *et al.*, 1992).

ITOKAWA *et al.* (1991) mostraram que alguns triterpenos provenientes do extrato metanólico quente da casca de raízes de *Maytenus ilicifolia* apresentam efeitos citotóxicos em culturas de células. SHIROTA *et al.* (1994) relatam o efeito citotóxico de triterpenos aromáticos de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus chuchuhuasca* também obtidos do extrato metanólico quente da casca de raízes das plantas.

ZHU *et al.* (1998) isolaram e elucidaram a estrutura de três glucosídeos, denominados ilicifolinosídeos A, B e C (Figura 8), do extrato etanólico a 70%, em temperatura ambiente, de folhas de *Maytenus ilicifolia*. OLIVEIRA *et al.* (2000) sugerem a presença de agentes oxidantes em folhas de *Maytenus ilicifolia*. LEITE *et al.* (2001) isolaram e quantificaram por HPLC flavonóides glicosilados do infuso aquoso de *Maytenus ilicifolia* (Figuras 9 e 10) e *Maytenus aquifolium*. Em estudo prévio, isolaram dois novos flavonóides-tetrassacarídeos do infuso de folhas de *Maytenus aquifolium* que mostraram atividade antiúlcera (Figura 11).

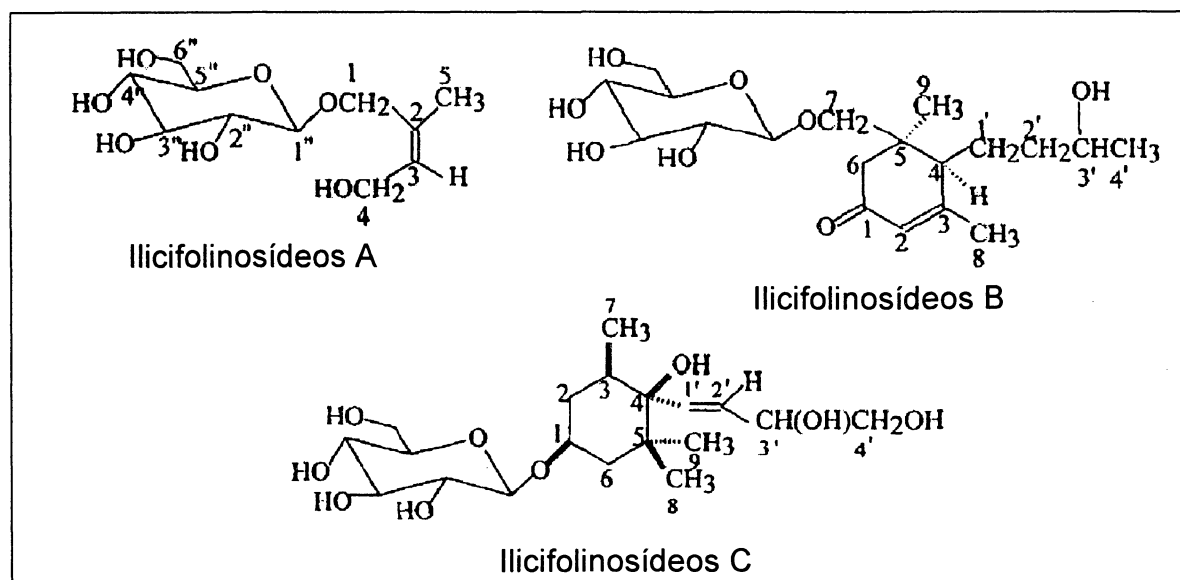


FIGURA 8 – Ilicifolinosídeos A, B e C, isolados das folhas da *Maytenus ilicifolia* (ZHU *et al.*, 1998).

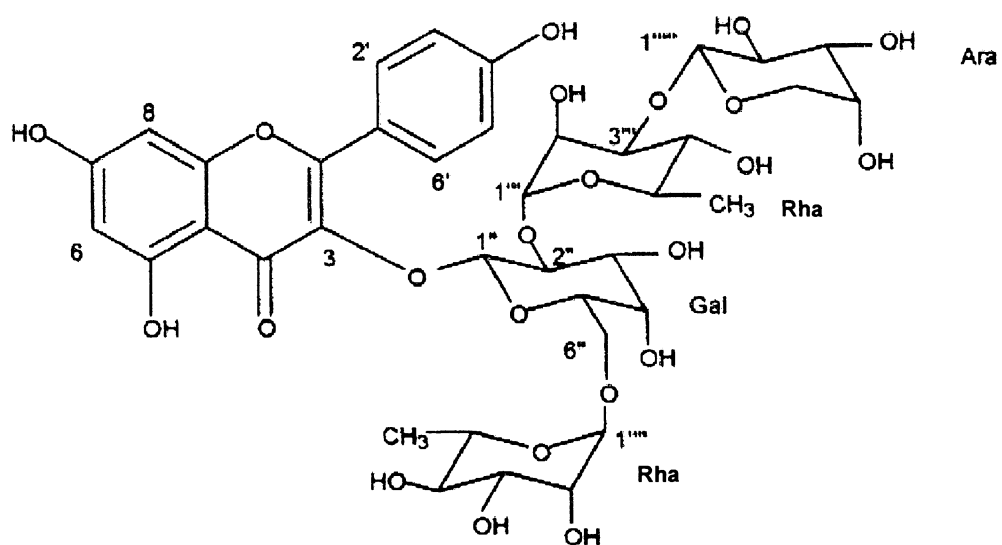
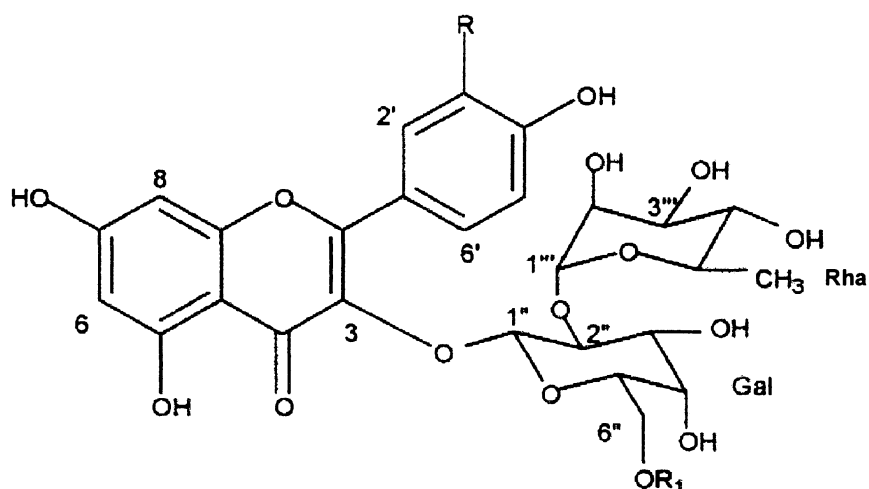


FIGURA 9 – Flavonóide tetra-glicosilado isolado das folhas da *Maytenus ilicifolia*: Kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE *et al.*, 2001).



Composto	R	R ₁
1	H	Rha
2	H	H
3	OH	Rha

FIGURA 10– Flavonóides glicosilados, isolados das folhas da *Maytenus ilicifolia*: (1) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O-[L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo, (2) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-galactopiranosídeo, e (3) quercetin-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE *et al.*, 2001).

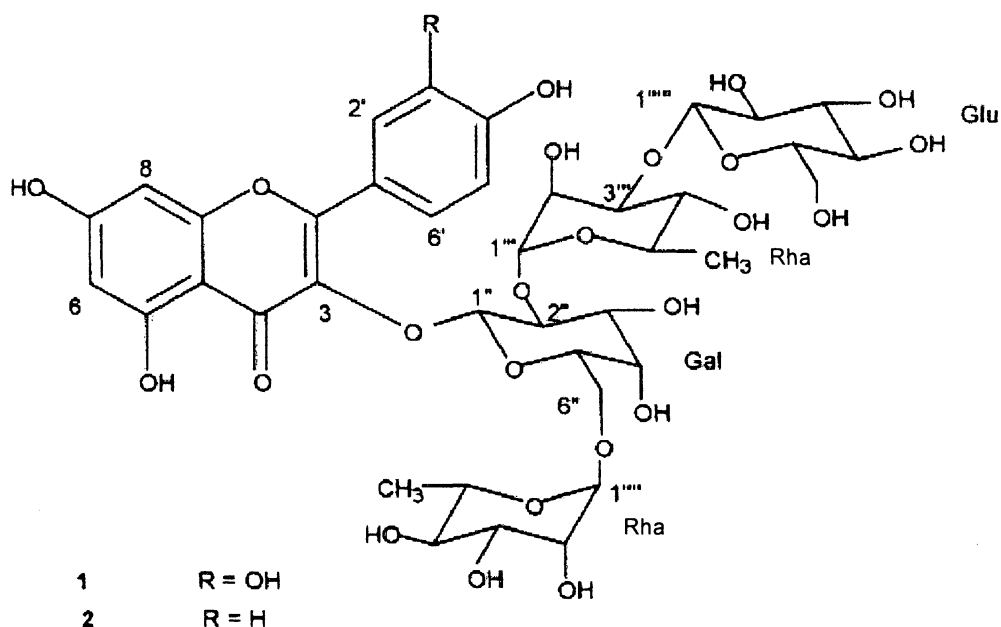


FIGURA 11 – Flavonóides tetra-glicosilados, isolados das folhas de *Maytenus aquifolium*: (1) quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)]-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo, (2) kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-galactopiranosídeo (LEITE *et al.*, 2001).

Não foi encontrado nenhum trabalho relatando estudos referentes a carboidratos (oligossacarídeos e polissacarídeos) da *Maytenus ilicifolia*. Os únicos achados referem-se a glicosídeos e às unidades de açúcares presentes na estrutura de flavonóides como relatado anteriormente. Também ainda não se sabe ao certo qual ou quais substâncias, presentes nas folhas da espinheira-santa, são responsáveis pelos efeitos antiulcerogênicos já comprovados cientificamente. Este é um motivo forte para a pesquisa de outros constituintes desta planta.

2.1. Objetivo Geral

Caracterização estrutural de polissacarídeos de folhas de *Maytenus ilicifolia*.

2.2. Objetivos Específicos

1. Extrair os polissacarídeos das folhas de *Maytenus ilicifolia*, determinar seus rendimentos e composição monossacarídica;
2. Purificar os principais polissacarídeos;
3. Caracterizar estruturalmente os principais polissacarídeos obtidos;
4. Analisar a composição de carboidratos do extrato metanol-aquoso e do sobrenadante etanólico da extração aquosa;
5. Verificar a presença de polissacarídeos no infuso (uso popular) das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material de Estudo

Folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. e.x. Reissek (Celastraceae), foram coletadas em Campo Magro, na região metropolitana de Curitiba. Esse material foi gentilmente fornecido pela Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná Ltda.

A amostra foi identificada pelo Prof. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da UFPR. Exemplares da mesma espécie, coletados em Curitiba, estão depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob números 30842 e 43795.

3.2. Extração dos Carboidratos (oligo- e polissacarídeos)

Folhas secas foram moídas para, posteriormente, serem submetidas aos processos de extração descritos a seguir.

3.2.1. Extração com Clorofórmio-Metanol

A amostra (118 g) foi deslipidificada e despigmentada com a mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v), sob refluxo, em banho-maria a 60°C, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato clorofórmio-metanólico foi filtrado a quente e evaporado até a secura em temperatura ambiente para cálculo do rendimento. O resíduo foi seco para sofrer o segundo processo de extração.

3.2.2. Extração com Metanol-Água

Este processo teve por finalidade a obtenção dos carboidratos de baixa massa molar, bem como uma maior despigmentação do material.

O resíduo seco da extração com clorofórmio-metanol foi submetido à extração com metanol-água (4:1 v/v), sob refluxo, em banho-maria a 80°C, por 2 horas. Este processo foi repetido duas vezes. Após cada etapa, o extrato metanol-aquoso foi

filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador e liofilizado para cálculo do rendimento. O resíduo foi seco para sofrer o terceiro processo de extração.

3.2.3. Extração Aquosa

O resíduo seco da extração com metanol-água foi submetido à extração aquosa, sob refluxo, em banho-maria a 100°C, por 3 horas. Este processo foi repetido duas vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume, precipitado com etanol (3 volumes) e centrifugado a fim de separar o precipitado do sobrenadante (carboidratos de baixa massa molar remanescentes da extração com metanol-água). O precipitado foi, então, dialisado e liofilizado para o cálculo do rendimento. O sobrenadante foi evaporado até a secura em rotaevaporador, solubilizado em pequeno volume de água e também liofilizado para o cálculo do rendimento.

3.2.4. Extração Alcalina I

O resíduo da extração aquosa foi extraído com KOH 2%, na presença de NaBH₄ (boroidreto de sódio), para evitar a degradação dos polissacarídeos a partir das suas extremidades redutoras, sob refluxo, em banho-maria a 100°C, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato foi filtrado a quente, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume, dialisado e liofilizado para cálculo do rendimento.

3.2.5. Extração Alcalina II

O resíduo da extração anterior foi submetido à extração com KOH 10%, sob refluxo, em banho-maria a 100°C, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato foi filtrado a quente, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume, dialisado e liofilizado para cálculo do rendimento.

3.2.6. Obtenção dos Polissacarídeos do Infuso

Folhas trituradas (70 g) foram submetidas à extração por infusão durante 5 horas. O extrato foi dialisado com a finalidade de eliminar os componentes de baixa massa molar. Posteriormente, o material retido no saco de diálise foi submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo (item 3.3.2). O sobrenadante deste procedimento foi, então, utilizado para a pesquisa de polissacarídeos. Com a finalidade de desproteíntização, esta fração foi tratada com TCA 5%.

3.3. Purificação dos Polissacarídeos

3.3.1. Obtenção dos Polissacarídeos Solúveis em Água do Extrato Alcalino I

A fração extraída com KOH 2% foi, inicialmente, fervida sob refluxo, por 30 minutos, em água destilada. Em seguida, a solução foi resfriada até temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e centrifugada, gerando um precipitado e um sobrenadante (fração solúvel em água).

3.3.2. Fracionamento dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

O precipitado etanólico obtido na extração aquosa, a fração solúvel em água do extrato KOH 2%, o extrato KOH 10% e a fração do infuso que ficou retida no saco de diálise foram submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo.

As frações foram solubilizadas em água destilada, congeladas e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (10.000 rpm / 15 min a 4°C). Esse processo foi repetido diversas vezes, até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento, e a partir do resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram reunidos, concentrados e liofilizados. Por este processo foram obtidas as frações precipitado e sobrenadante do congelamento e degelo.

3.3.3. Fracionamento dos Polissacarídeos pelo Método de Fehling

Após o fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo, algumas frações foram submetidas ao fracionamento pelo método de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965).

As amostras foram solubilizadas diretamente na solução B de Fehling (KOH + tartarato de sódio e potássio) e a estas adicionou-se igual volume da solução A de Fehling (sulfato de cobre). Após forte agitação manual o material permaneceu em geladeira por cerca de 2 horas. O precipitado foi separado do sobrenadante mediante centrifugação (10.000 rpm / 15 min a 25°C). Tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram dialisados, agitados em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida para eliminar o cobre residual e novamente dialisados. As frações obtidas foram concentradas e liofilizadas.

3.3.4. Fracionamento dos Polissacarídeos por Coluna de Troca Iônica DEAE-Sephacrose "Fast Flow"

As frações que passaram por esta etapa de purificação foram solubilizadas em água destilada, aplicadas em coluna DEAE-Sephacrose "Fast Flow" e eluídas com água destilada e soluções de NaCl em concentrações crescentes (0,1, 0,5 e 2 mol/l). A eluição de cada fração foi controlada pela determinação da presença de açúcares pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo interrompida quando este era negativo.

3.4. Análise Estrutural dos Polissacarídeos Isolados

3.4.1. Composição em Monossacarídeos

3.4.1.1. Hidrólise ácida total

Aproximadamente 3 mg de amostra foram tratados com 1,5 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 2 mol/l, durante 8 horas a 100°C ou TFA 1 mol/l "overnight", também a 100°C. Posteriormente, o TFA foi removido por evaporação até a secura. O

material foi solubilizado em pequeno volume de água e uma parte foi separada para cromatografia em papel. A outra parte foi reduzida e acetilada.

3.4.1.2. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBH_4 (pH 9-10), em temperatura ambiente, por aproximadamente 16 horas. Depois, as soluções foram neutralizadas com ácido acético glacial, evaporadas e co-evaporadas com metanol (cerca de 5 vezes), a fim de eliminar o boro na forma de borato de trimetila.

Posteriormente, os alditóis obtidos foram acetilados por uma das duas maneiras a seguir: 1) com anidrido acético (~1,5 ml), em estufa a 120°C por 1 hora e extraídos com clorofórmio, que foi, em seguida, lavado diversas vezes com água destilada para eliminar o ácido acético residual; 2) com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v, 2 ml), “overnight”, à temperatura ambiente e extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO_4 (sulfato de cobre) a 5% para eliminar a piridina residual. A fase clorofórmica foi desidratada com Na_2CO_3 (carbonato de sódio) anidro e filtrada por algodão. Após secura, os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS.

3.4.1.3. Determinação dos alditóis livres presentes nas frações EMA e SEEA (Extrato Metanol-Aquoso e Sobrenadante Etanólico da Extração Aquosa)

A quantidade em g% de alditóis livres presentes em EMA e SEEA foi determinada em GC-MS utilizando um padrão interno de alitol.

Inicialmente, o padrão de alitol foi acetilado e analisado em GC-MS para garantir que este se apresentava puro. Posteriormente, 0,5 mg de alitol foi adicionado a 5 mg de EMA e SEEA. Esse material foi, então, acetilado e analisado por GC-MS.

3.4.2. Metilação dos Polissacarídeos e Análise na Forma de Acetatos de Alditóis

Os polissacarídeos foram metilados pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). O polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em Me_2SO (dimetilsulfóxido),

tratado com CH_3I (iodeto de metila) em meio alcalino e agitado em vortex por 30 min. Em seguida, permaneceu reagindo “overnight”. A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução acidificada com ácido acético (para polissacarídeos neutros presentes) ou H_2SO_4 diluído (para polissacarídeos ácidos presentes). O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material submetido à metanólise com solução de ácido clorídrico em metanol a 3,0% (v/v), durante 2 horas, a 80°C . A seguir, a metanólise foi neutralizada com Ag_2CO_3 (carbonato de prata) e os metil-glicosídeos extraídos com acetona. O material foi evaporado à secua em rotaevaporador à temperatura ambiente e submetido a uma hidrólise com H_2SO_4 1 mol/l, durante 8 horas, a 100°C . Depois, o material foi neutralizado com BaCO_3 (carbonato de bário), filtrado, reduzido com NaB^2H_4 (boroidreto de sódio deuterado) e acetilado (item 3.4.1.2). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS.

3.4.3. Hidrólise Ácida Parcial

Para determinar a condição ideal de hidrólise ácida parcial, 10 mg de polissacarídeo foram tratados com TFA 0,2 mol/l a 100°C . Após 30 min, 1 e 2 horas de hidrólise, uma alíquota do material foi coletada para a determinação da composição monossacarídica. Para essa determinação, o TFA foi evaporado, o material residual ressuspensionado em pequeno volume de água destilada, reduzido e acetilado.

Determinada a condição ideal de hidrólise, 1 g do polissacarídeo foi hidrolisado com 50 ml de TFA 0,2 mol/l a 100°C por 2 horas. Posteriormente, o material foi concentrado em rotaevaporador, ressuspensionado em pequeno volume de água destilada e tratado com acetona (3 volumes) para precipitar o polissacarídeo resultante da hidrólise ácida parcial. O precipitado foi, então, separado por centrifugação (12.000 rpm / 20 min a 15°C), ressuspensionado em pequeno volume de água destilada, congelado e liofilizado. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador, ressuspensionado em água destilada, congelado e liofilizado.

3.4.4. Hidrólise Ácida Parcial para Obtenção de Oligossacarídeos Ácidos

Para a obtenção de oligossacarídeos ácidos, o polissacarídeo resultante da hidrólise ácida parcial (item 3.4.3), um polímero contendo um alto teor de ácidos urônicos, foi hidrolisado com TFA 1 mol/l, por 3 horas, a 100°C. O material hidrolisado foi concentrado em rotaevaporador, ressuspendido em água destilada, congelado e liofilizado. Os oligossacarídeos obtidos foram separados por cromatografia em papel preparativa, conforme descrito no item 3.6.1.2.

3.4.5. Hidrólise Ácida dos Oligossacarídeos Ácidos

A fração contendo oligossacarídeos ácidos foi hidrolisada com TFA 2 mol/l, a 100°C, por 5 horas. Após completa evaporação do TFA, o material foi ressuspendido em água ultra pura (Milli-Q), filtrado através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio de poros de 0,22 µm, e analisado em HPLC.

3.4.6. Carboxi-Redução

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972), que consiste na reação de ácidos hidroxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH₄. Neste caso, os resíduos de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidos no seu açúcar neutro correspondente.

Para isso, 100 mg do polissacarídeo foram dissolvidos em 10 ml de tampão MES (2-[N-morpholine]-ethanosulfonic acid) (0,2 mol/l, pH 4,75) e a este adicionaram-se, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida (CMC) para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura de reação ficou sob agitação por um total de duas horas. Em seguida, adicionou-se tampão TRIS (aminometilidenotrimetanol) (2 mol/l, pH 7,0) até pH 7,0 (5 ml) e, posteriormente, acrescentou-se NaBH₄ para uma concentração final de 2 mol/l (1,13 g). A redução ocorreu “overnight” e foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 8.000 Da durante 48 horas, concentrado e liofilizado. Todo o processo de carboxi-redução

foi repetido mais uma vez, para garantir a eficácia do procedimento. A única diferença foi que no segundo processo apenas a metade de CMC foi utilizada, uma vez que boa parte dos ácidos urônicos já deveriam estar reduzidos ao seu açúcar neutro correspondente.

3.5. Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar

3.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos (HPSEC-MALLS)

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados no aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC), com quatro colunas ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série (com limites de exclusão de $1 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$, respectivamente), um refratômetro diferencial, modelo Waters 2410 e um detector de espalhamento de laser multiângulo (MALLS) a 632,8 nm, modelo Dawn DSP, que promove a leitura do espalhamento de luz, que é captado em diferentes intensidades por detectores em diferentes ângulos.

Como eluente, foi usada uma solução de NaNO_2 (nitrito de sódio) 0,1 mol/l contendo NaN_3 (azida de sódio) 0,2 g/l, com fluxo controlado de 0,6 ml/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/ml, e filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,22 μm . Uma quantidade de 200 μl foi injetada no aparelho e os resultados foram fornecidos diretamente através de um computador acoplado ao sistema, utilizando o software ASTRA 4.70.07.

Para a obtenção da massa molar, foi determinado, após ter sido verificado que a amostra apresentava-se homogênea, o valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com a concentração), uma vez que essa é uma característica específica de cada molécula. Para isso, a amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/ml, e filtrada através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,45 μm . A amostra foi diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0

mg/ml e analisada utilizando-se apenas o detector de índice de refração (para a determinação do dn/dc não se utilizam as colunas nem o detector de espalhamento de luz). O fluxo do solvente foi de 0,1 ml/min e uma quantidade de 200 μ l de amostra foi injetada no equipamento. O resultado foi fornecido diretamente através do software ASTRA 4.70.07.

3.6. Métodos Analíticos

3.6.1. Métodos Cromatográficos

3.6.1.1. Cromatografia em papel

As análises cromatográficas qualitativas dos monossacarídeos e oligossacarídeos foram realizadas pela técnica descendente, com o sistema de solvente butanol-piridina-água (5:3:3 v/v), em papel Whatman nº 1 (HOUGH e JONES, 1962).

A detecção dos carboidratos foi realizada com $AgNO_3$ (nitrato de prata) alcalino, segundo TREVELYAN *et al.* (1950).

3.6.1.2. Cromatografia preparativa em papel

Os oligossacarídeos ácidos obtidos no item 3.4.4 foram cromatografados em papel Whatman nº 3, com o sistema de solvente butanol:piridina:H₂O (5:3:3 v/v), pela técnica descendente, por 48 e 132 horas.

As frações a serem isoladas foram localizadas pela coloração de tiras laterais do papel cromatográfico com nitrato de prata alcalino (TREVELYAN *et al.*, 1950). Cada fração foi extraída do papel com água destilada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada. A homogeneidade de cada uma foi avaliada em HPLC (item 3.6.1.4).

3.6.1.3. Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em cromatógrafo VARIAN, modelo Saturn 2000R – 3800 gas chromatography acoplado a um espectrômetro de massa VARIAN, modelo Saturn 2000R – mass spectroscopy detector “Ion Trap”, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e hélio ultra puro, a um fluxo de 1,5 ml/min, como gás de arraste.

3.6.1.4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

As análises foram realizadas em aparelho SHIMADZU com detecção por índice de refração (10A SHIMADZU) à temperatura de 40°C. Foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (Rezex 8 μ m, 300 x 780 mm - PHENOMENEX) a 65°C. A fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico 8 mmol/l em água ultra pura (Milli-Q), degaseificada com gás hélio, com um fluxo de 0,6 ml/min. As amostras foram solubilizadas em água ultra pura, filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio de poros de 0,22 μ m e, então, analisadas. O volume de injeção foi de 20 μ l.

3.6.2. Métodos Espectroscópicos

3.6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN mono- e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400, incorporados a transformador de Fourier, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em “probes” de 5 mm de diâmetro, à temperatura de 50°C, utilizando como solventes água deuterada (D₂O) ou Dimetilsulfóxido deuterado (Me₂SO-*d*₆). Foram utilizados acetona ou Me₂SO-*d*₆ como padrões internos e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m.

3.6.2.2. Infravermelho

As análises de infravermelho, acopladas à transformada de Fourier (FT-IR), foram obtidas em espectrômetro BOMEM HARTMAN (MB-series), utilizando discos de KBr (brometo de potássio) de 100 mg contendo 2 % de amostra.

3.6.3. Métodos Espectrofotométricos

- A determinação de açúcares totais foi realizada segundo DUBOIS *et al.* (1956). Foi 0,5 ml de solução amostra, sobre a qual adicionou-se 0,5 ml de solução de fenol (5%) e, em seguida, 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. A presença de açúcares é visualizada pelo aparecimento de uma coloração alaranjada. A sensibilidade do método é de aproximadamente 20-100 µg/ml de açúcar, com leitura em 490 nm. O padrão utilizado foi o açúcar presente em maior quantidade em cada uma das frações analisadas.

- A determinação de ácidos-urônicos foi realizada segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Foi utilizado 0,4 ml de amostra, sobre a qual adicionaram-se 40 µl de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/l (pH 1,6). Em seguida, foram adicionados 2,4 ml de tetraborato de sódio (75 mmol/l em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vortex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriar os tubos até temperatura ambiente (em banho de gelo), adicionaram-se 80 µl de meta-hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) e agitou-se novamente em vortex. A presença de ácidos urônicos é visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico (em 0,4 ml de amostra), com leitura em 525 nm. O ácido glucurônico foi utilizado como padrão.

- A dosagem de proteínas totais foi realizada pela precipitação das proteínas pelo método de PETERSON (1977) e determinação pelo método de HARTREE (1972). Para a precipitação utilizou-se 1 ml de amostra sobre a qual foi adicionado 0,1 ml de deoxicolato (0,15%). A solução foi agitada e mantida por 10 min à temperatura

ambiente. Em seguida adicionou-se 0,1 ml de TCA (72%), agitou-se e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de água destilada para a determinação de proteínas. Sobre esse 1 ml foi adicionado 0,9 ml do reagente A (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 g de Na_2CO_3 em 500 ml de NaOH 1 mol/l são dissolvidos em 1000 ml de água destilada q.s.p.). A solução permaneceu em banho-maria a 50°C durante 10 min. Em seguida ela foi resfriada até temperatura ambiente e adicionou-se 0,1 ml do reagente B (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 90 ml de água destilada, sobre o qual adiciona-se 10 ml de NaOH 1 mol/l), permanecendo 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 3 ml do reagente C (1 ml de reagente de Folin Ciocalteu 2N diluído em 15 ml de água destilada, sendo o volume final 16 ml), e a solução permaneceu em banho-maria a 50°C durante 10 min e em seguida foi resfriada à temperatura ambiente. A presença de proteínas é visualizada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada. A sensibilidade do método é de 10-100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, com leitura em 650 nm. Soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

3.6.4. Métodos Analíticos Gerais

- As pesagens foram realizadas em balanças analíticas ACCULAB, modelos LA-200 e V-1200.
- As evaporações e concentrações das soluções foram realizadas em rotaevaporador FISATOM, modelo 802, sob pressão reduzida, em temperaturas que variaram de 25 a 50°C.
- As liofilizações das soluções foram feitas em aparelho EDWARDS.
- As medidas e aferições de concentrações hidrogeniônicas (pH) foram procedidas em potenciômetro MICRONAL, modelo B222.

- As centrifugações foram realizadas em centrífuga HITACHI, modelo Himac CR21E.
- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em aparelho HITACHI, modelo U-2001.
- As folhas foram moídas em moinho tipo Willye TE-650 da TECNAL.
- As diálises foram realizadas em MEMBRA-CEL com limite de exclusão de 8.000 e 14.000 Da.
- Os reagentes e solventes utilizados apresentam grau de pureza P.A.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração dos Carboidratos

Folhas secas e moídas (118 g) foram deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e, em seguida, sofreram a extração dos carboidratos de baixa massa molar. O material residual passou pelos processos de obtenção dos polissacarídeos. O procedimento de extração pode ser visualizado na Figura 12.

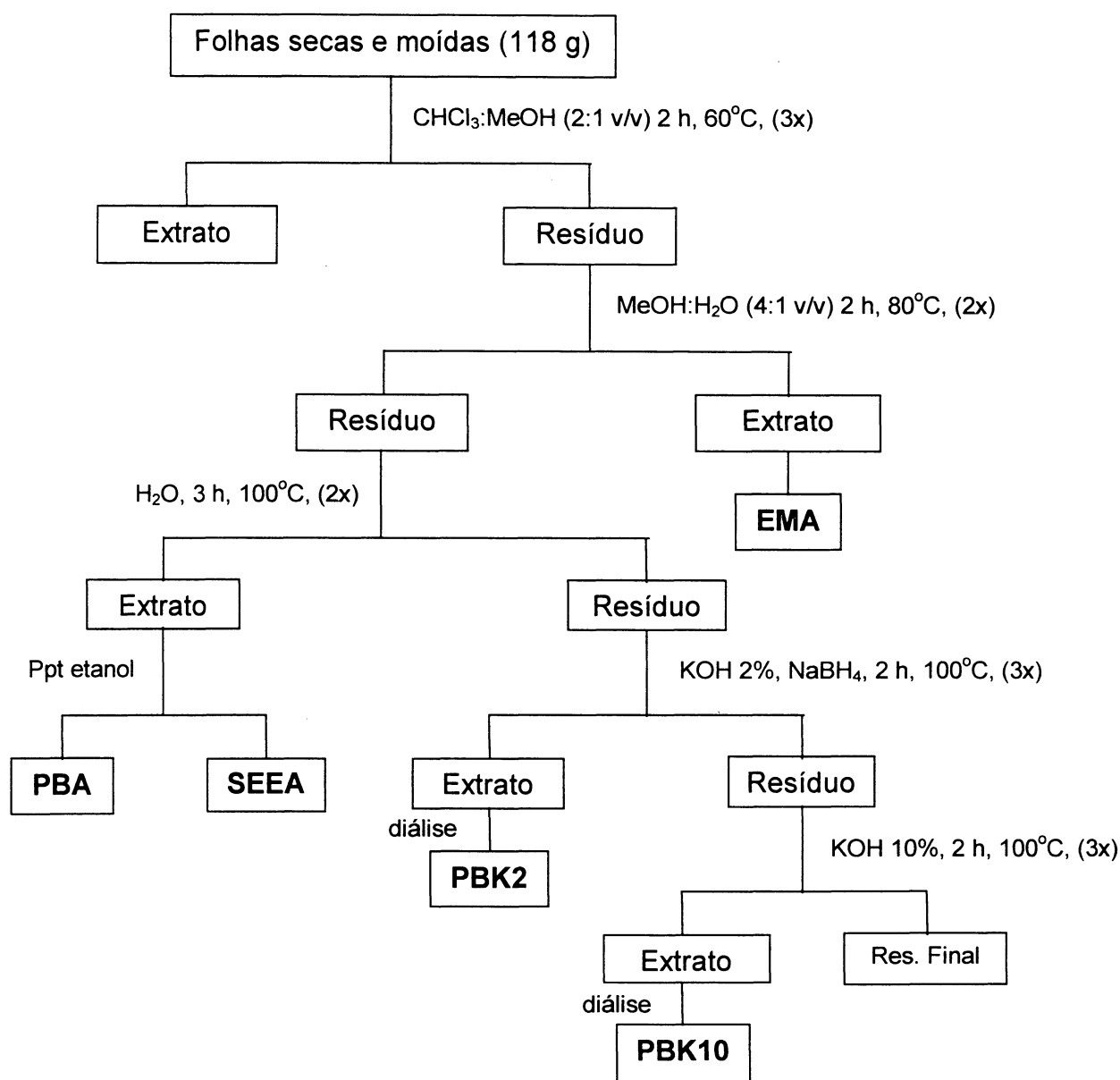


FIGURA 12 – Fluxograma do processo de extração dos carboidratos das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

Notas: EMA (extrato metanol-aquoso); SEEA (sobrenadante etanólico da extração aquosa); PBA (polissacarídeo bruto da extração aquosa); PBK2 (polissacarídeo bruto da extração com KOH 2%); PBK10 (polissacarídeo bruto da extração com KOH 10%).

4.2. Rendimento e Composição Monossacarídica das Extrações

O rendimento de todos os processos de extração, bem como a composição monossacarídica de cada fração podem ser observados na Tabela 1. A prévia deslipidificação e despigmentação com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) resultou em uma fração com rendimento de 13 g%.

TABELA 1 – RENDIMENTO, DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS DIVERSAS EXTRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Frações	Rendimento Bruto (g%)	⁽¹⁾ Açúcar Total (g%)	Monossacarídeos (%)						
			Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ác
EMA	23,0	13,7	4,8	6,7	-	1,3	77,4	8,4	nd
SEEA	1,7	12,0	6,3	10,5	-	1,1	69,5	12,6	nd
PBA	1,9	70,8	2,2	10,5	1,0	1,6	5,9	3,1	75,7
PBK2	20,0	26,9	8,2	48,4	-	0,7	10,8	2,2	29,7
PBK10	3,7	82,3	2,1	10,0	59,3	-	7,0	9,5	12,1

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Determinação do açúcar total segundo DUBOIS *et al.* (1956); (2) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Rha (ramnose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác (ácido urônico); nd (não determinado); EMA (extrato metanol-aquoso); SEEA (sobrenadante etanólico da extração aquosa); PBA (polissacarídeo bruto da extração aquosa); PBK2 (polissacarídeo bruto da extração com KOH 2%); PBK10 (polissacarídeo bruto da extração com KOH 10%).

Analisando a Tabela 1, pode-se observar que as frações EMA e PBK2, apesar de apresentarem um bom rendimento no processo de extração (23 e 20 g%, respectivamente), possuem um baixo teor de açúcar total (13,7 e 26,9 g%) e a fração SEEA apresenta um baixo rendimento tanto no processo de extração (1,7 g%) quanto no teor de açúcar total (12 g%). Já as frações PBA e PBK10 apresentaram um baixo rendimento no processo extrativo (1,9 e 3,7 g%, respectivamente), porém um alto teor de açúcar total (70,8 e 82,3 g%).

A análise da composição monossacarídica da Tabela 1 indica que o extrato aquoso (PBA) contém um alto teor de ácidos urônicos (75,7%). Isso deve-se,

provavelmente, aos polissacarídeos pécticos presentes na parede celular e que foram obtidos pela extração aquosa.

Já o extrato alcalino 2% (PBK2), provavelmente, contém uma arabinogalactana, por apresentar 48,4 g% de arabinose e 10,8 g% de galactose como açúcares predominantes em seus polissacarídeos. Em relação ao extrato alcalino 10% (PBK10), observou-se 59,3 g% de xilose, o que indica a provável presença de uma xilana. As frações EMA e SEEA, em que estão os carboidratos de baixa massa molar, são ricas em galactose (77,4 e 69,5, respectivamente).

4.3. Purificação do Polissacarídeo da Fração PBK2

Com o objetivo de trabalhar apenas com o material solúvel em água da fração PBK2 (polissacarídeo bruto da extração com KOH 2%), esta foi inicialmente fervida sob refluxo, em água destilada (ver item 3.3.1). Em seguida, a fração solúvel passou pelos processos de purificação de congelamento e degelo, e fracionamento por coluna de troca iônica DEAE-Sepharose “Fast Flow”. O esquema de purificação do polissacarídeo da fração PBK2 pode ser visualizado na Figura 13.

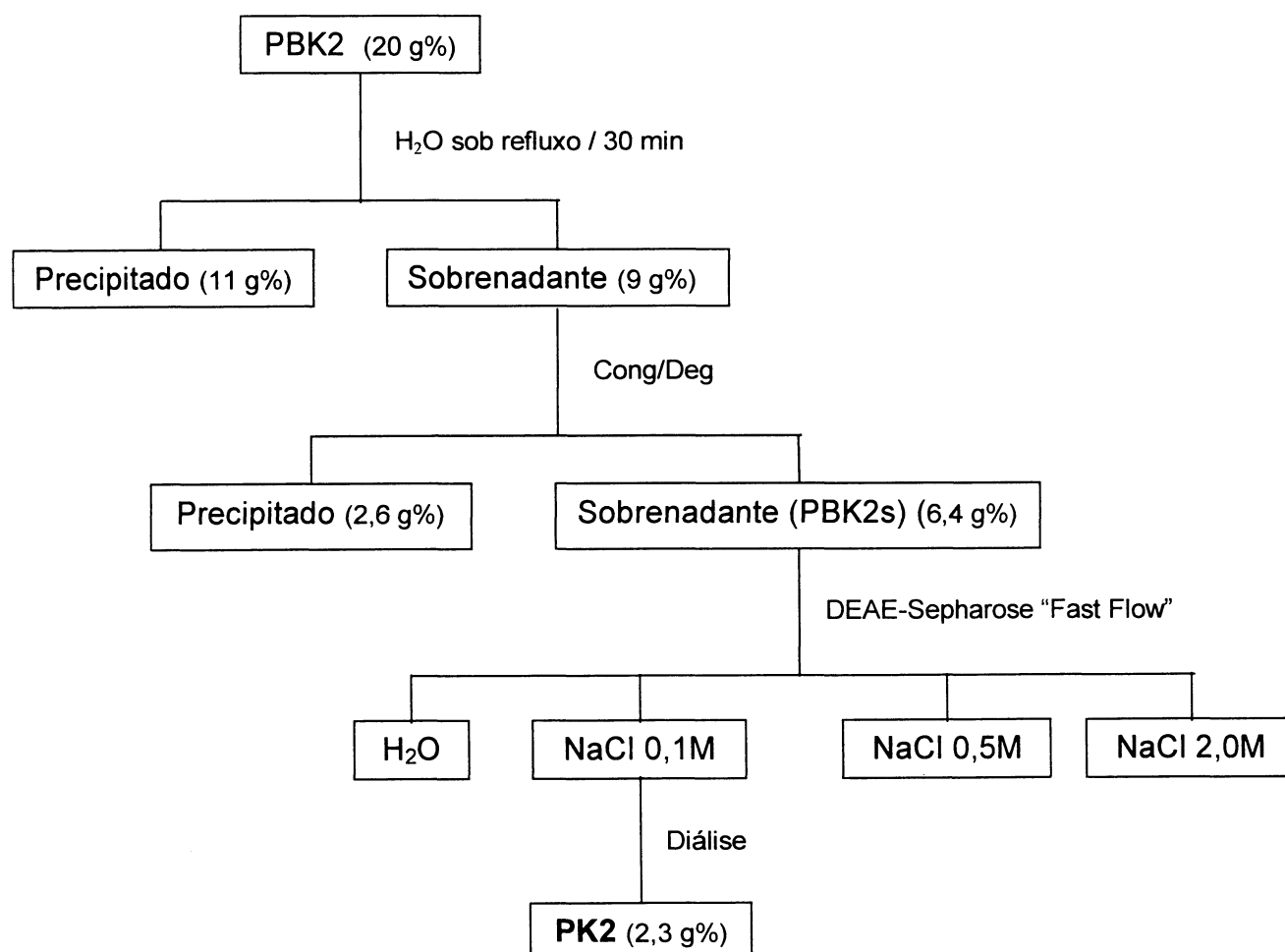


FIGURA 13 – Fluxograma do processo de purificação do polissacarídeo da fração PBK2.

As frações obtidas pelo fracionamento em coluna DEAE-Sepharose “Fast Flow” foram analisadas quanto ao perfil de eluição em HPSEC-MALLS. A fração PK2 foi a única a apresentar-se homogênea e seu perfil de eluição pode ser visualizado na Figura 14, em comparação com o material antes de ser fracionado em coluna DEAE-Sepharose “Fast Flow” (PBK2s), composto por pelo menos três moléculas distintas, cujos tempos de eluição estão entre 40 e 60 minutos.

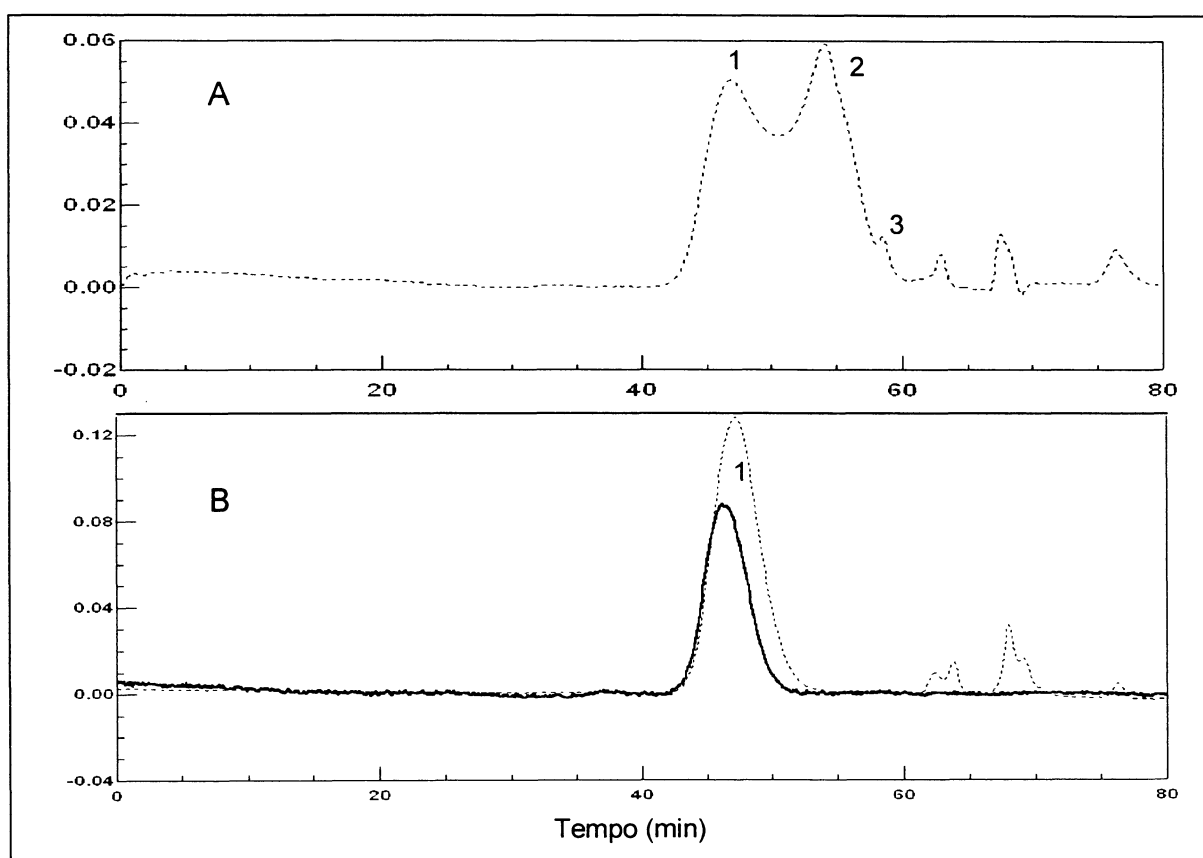


FIGURA 14 – Perfis de eluição de PBK2s (A) contendo três moléculas distintas (1,2 e 3), e PK2 (B) com uma única molécula (1), em HPSEC-MALLS.

Nota: A linha inteira representa o espalhamento de luz no detector de 90° e a linha pontilhada, o índice de refração.

4.3.1. Análise do Polissacarídeo PK2

Através de análise em HPSEC-MALLS, foram determinados o dn/dc e a massa molar de PK2, respectivamente, 0,157 e 87.000 g/mol.

PK2 foi, então, analisado quanto a sua composição em monossacarídeos, na forma de acetatos de alditóis em GC-MS, apresentando 5% de ramnose, 69% de arabinose, 19,5% de galactose e 6,5% de ácido urônico, estes últimos dosados de acordo com FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Dessa forma, PK2, uma arabinogalactana ácida, foi analisada através da técnica de RMN- ^{13}C (Figura 15).

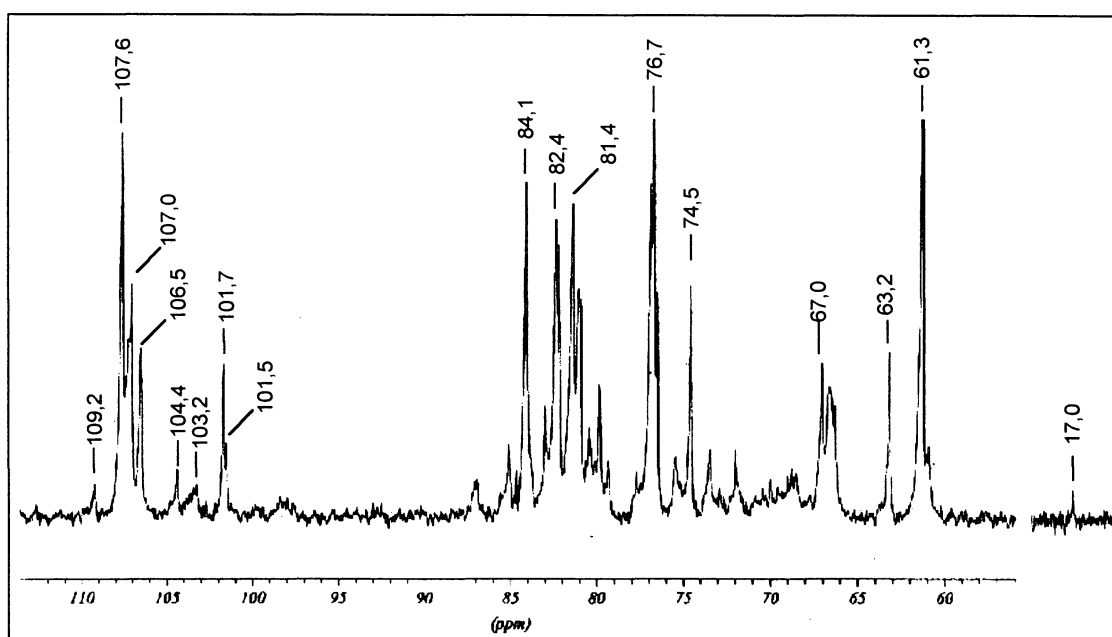


FIGURA 15 - Espectro de RMN- ^{13}C da arabinogalactana (PK2) em D_2O , a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

O espectro de RMN- ^{13}C mostra que a arabinogalactana em questão (PK2) apresenta um elevado grau de complexidade quanto à sua estrutura molecular, devido à existência de uma série de sinais detectados na região anomérica (101,5 – 109,2 p.p.m). Apesar desta molécula apresentar 6,5% de ácidos urônicos, não foi evidenciado o sinal referente ao C-6 do grupamento carboxílico em 175,0 ppm. A presença de $-CH_3$ da ramnose é demonstrada com o sinal em 17,0 ppm (GORIN e MAZUREK, 1975).

Sinais em 106,5, 107,0, 107,6 e 109,2 ppm correspondem, provavelmente, aos deslocamentos químicos do C-1 de unidades de α -arabinofuranose (TISCHER *et al.*, 2002; DONG e FANG, 2001; FRANSEN *et al.*, 2000; DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998). Os sinais em 103,2 e 104,4 ppm, que aparecem com baixa intensidade, devem representar o C-1 de unidades de β -galactopirranose (TISCHER *et al.*, 2002; DONG e FANG, 2001; FRANSEN *et al.*, 2000; DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998; GORIN e MAZUREK, 1975) e os dois sinais em 101,5 e 101,7 ppm foram atribuídos ao C-1 de α -ramnopirranose (TISCHER *et al.*, 2002; GORIN e MAZUREK, 1975).

Para complementar os dados estruturais, foi realizada análise de metilação, cujo resultado está apresentado na Tabela 2. Pode-se concluir que este polissacarídeo é altamente ramificado, apresentando 30% de terminais não redutores, a maioria constituídos por unidades de arabinofuranose. Observa-se, nesta estrutura, a presença de ligação 1 \rightarrow 5 nas unidades de arabinofuranose, através dos derivados metilados 2,3-Me₂-Ara (21,1%), 2-Me-Ara (5,0%) e 3-Me-Ara (11,5%), bem como a presença de ligação 1 \rightarrow 3 pelo derivado 2,5-Me₂-Ara (10,7%). Os derivados metilados 2-Me-Ara e 3-Me-Ara demonstram também a presença das ligações 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 2, respectivamente, nas unidades de arabinofuranose. Também observou-se a presença dos derivados 2,3,6-Me₃-Gal (10,2%) e 2,3-Me₂-Gal (2,4%), demonstrando a ligação 1 \rightarrow 4 entre as unidades de galactopirranose, e dos derivados 2,3,4-Me₃-Gal (1,5%), 2,3-Me₂-Gal (2,4%) e 2,4-Me₂-Gal (1,7%), demonstrando a ligação 1 \rightarrow 6. A presença do derivado metilado 2,4-Me₂-Gal (1,7%) também comprova a existência de ligação em O-3. As unidades de ramnose presentes estão ligadas por 1 \rightarrow 2 e 1 \rightarrow 2,4, como é demonstrado pela presença dos derivados 3,4-Me₂-Rha (1,4%) e 3-Me-Rha (4,5%), respectivamente.

TABELA 2 – ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DO POLISSACARÍDEO PK2.

Derivado Metilado	Tipo de Ligação	%
2,3,5-Me ₃ -Ara	⁽¹⁾ (TNR)- <i>f</i>	26,8
2,5-Me ₂ -Ara	(1→3)- <i>f</i>	10,7
2,3-Me ₂ -Ara	(1→5)- <i>f</i>	21,1
2-Me-Ara	(1→3,5)- <i>f</i>	5,0
3-Me-Ara	(1→2,5)- <i>f</i>	11,5
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	(TNR)- <i>p</i>	3,2
2,4,6-Me ₃ -Gal	(1→3)- <i>p</i>	⁽²⁾ Tr
2,3,6-Me ₃ -Gal	(1→4)- <i>p</i>	10,2
2,3,4-Me ₃ -Gal	(1→6)- <i>p</i>	1,5
2,3-Me ₂ -Gal	(1→4,6)- <i>p</i>	2,4
2,4-Me ₂ -Gal	(1→3,6)- <i>p</i>	1,7
3,4-Me ₂ -Rha	(1→2)- <i>p</i>	1,4
3-Me-Rha	(1→2,4)- <i>p</i>	4,5

NOTAS: (1) Terminal Não Redutor; (2) Traços.

Como demonstrado através da técnica de RMN-¹³C, que mostrou a existência de inúmeros sinais na região anomérica, e de metilação, com a presença de diversos derivados metilados, o polissacarídeo PK2 apresenta uma estrutura bastante complexa.

4.3.2. Hidrólise Ácida Parcial de PK2

Com o objetivo de se chegar à cadeia principal da arabinogalactana (PK2), esta foi hidrolisada parcialmente em diferentes tempos para se determinar a condição ideal de hidrólise, que seria aquela em que grande parte das unidades de arabinose do polissacarídeo seriam hidrolisadas e, no entanto, ainda haveria uma quantidade significativa de galactose fazendo parte da cadeia principal. A composição de

monossacarídeos, liberados por este processo nos diferentes tempos, está demonstrada na Tabela 3.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA EM DIFERENTES TEMPOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA ARABINOGLACTANA (PK2) EXTRAÍDA DE FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Monossacarídeos	⁽¹⁾ Tempo de Hidrólise		
	30 min	1 h	2 h
Ramnose	-	1,3	2,5
Arabinose	93,3	89,9	83,5
Galactose	6,7	8,8	14,0
⁽²⁾ Ara/Gal	13,9	10,2	6,0

NOTAS: (1) Hidrólise com TFA 0,2 M a 100 °C

(2) Relação Arabinose/Galactose (essa relação na hidrólise total é de 69/19,5, o que corresponde a 3,5)

Através da análise dos diferentes tempos de hidrólise ácida parcial verificou-se que a arabinose é extremamente lábil e que após 2 horas praticamente toda a arabinose foi removida. A relação final de arabinose/galactose na hidrólise ácida total é de 3,5 e, em 2 horas de hidrólise ácida parcial esta relação é de 6,0. Assim, foi adotado o tempo de 2 horas como ideal para a obtenção de um polissacarídeo residual rico em galactose, mesmo que um percentual de galactose seja hidrolisado.

Então, 1 g da arabinogalactana foi hidrolisado parcialmente (conforme item 3.4.3), rendendo 120 mg de polissacarídeo residual, obtido por precipitação com acetona (3 volumes). Esse polissacarídeo residual, resistente à hidrólise ácida parcial, foi chamado de PK2-hp.

4.3.3. Análise de PK2-hp

O perfil de eluição de PK2-hp em HPSEC-MALLS (Figura 16), mostrou que esta era uma fração homogênea.

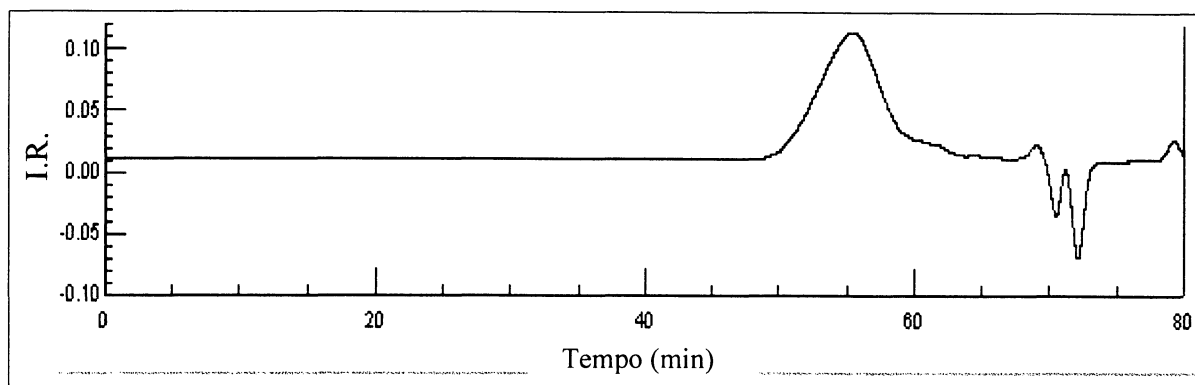


FIGURA 16 - Perfil de eluição de PK2-hp em HPSEC-MALLS, utilizando apenas o índice de refração (I.R.).

PK2-hp apresentou uma composição monossacarídica de 14% de ramnose, 3% de arabinose, 34% de galactose e 49% de ácido urônico, demonstrando a eficiência da hidrólise ácida parcial realizada, uma vez que praticamente toda a arabinose foi removida do polissacarídeo original PK2. A grande quantidade de ácido urônico é explicada, pois as ligações glicosídicas envolvendo ácidos urônicos são mais resistentes à hidrólise ácida. É também interessante observar a grande quantidade de ramnose que continua presente no polissacarídeo após a hidrólise ácida parcial. Isso se deve, provavelmente, ao fato dessas unidades de ramnose estarem ligadas a unidades de ácidos urônicos.

PK2-hp foi então analisado através da técnica de RMN- ^{13}C e o espectro pode ser visualizado na Figura 17.

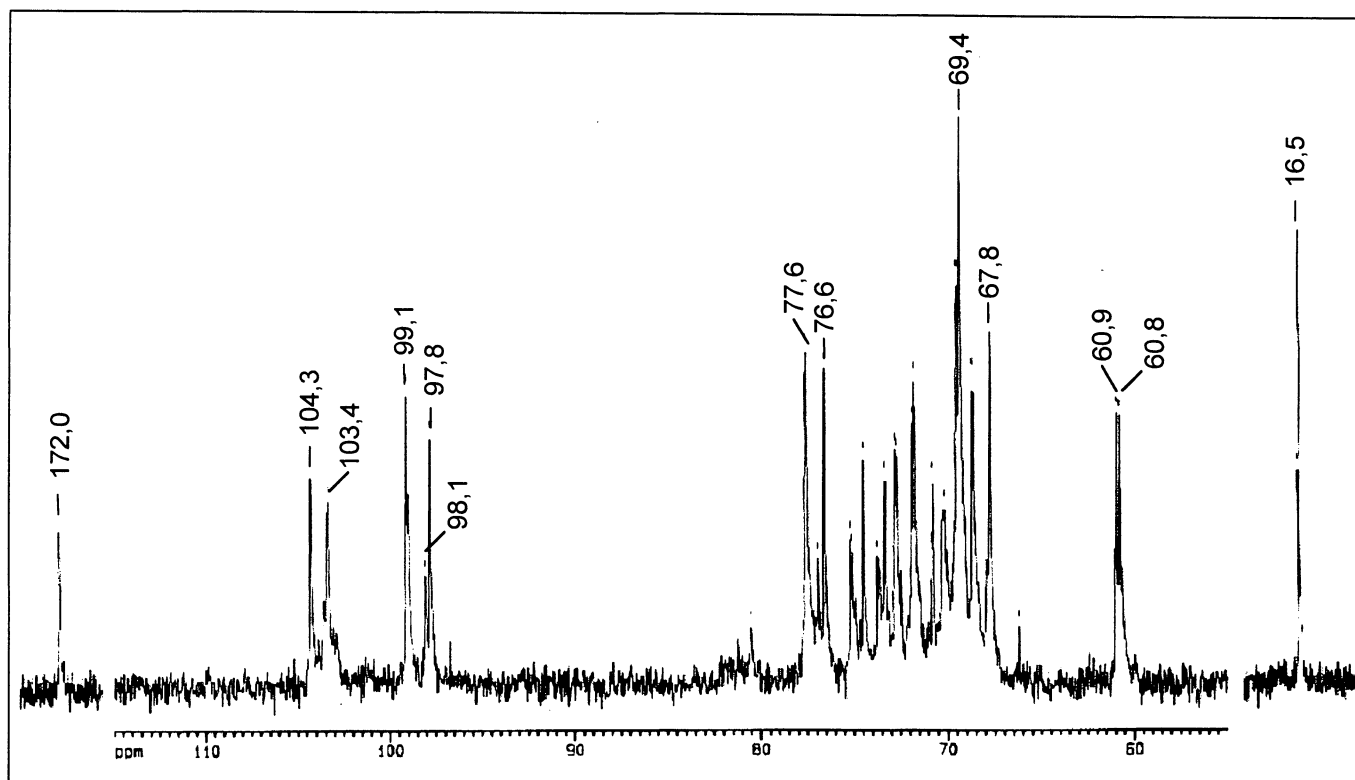


FIGURA 17 - Espectro de RMN- ^{13}C de PK2-hp em D_2O , a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

O espectro de RMN- ^{13}C de PK2-hp mostra que os sinais referentes às unidades de arabinose (106,5 – 109,2 ppm) desapareceram, o que indica realmente a eficiência da hidrólise ácida parcial. O sinal referente ao C-6 do grupamento carboxílico de ácidos urônicos foi observado em 172,0 ppm e, a presença de $-\text{CH}_3$ da ramnose é demonstrada com o sinal em 16,5 ppm (GORIN e MAZUREK, 1975).

Os sinais referentes ao C-1 das unidades de β -galactopirranose se intensificaram e aparecem em 104,3 e 103,4 ppm (TISCHER *et al.*, 2002; DONG e FANG, 2001; FRANSEN *et al.*, 2000; DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998; GORIN e MAZUREK, 1975;). O sinal em 99,1 ppm foi atribuído como referente ao C-1 das unidades de α -ramnopirranose e os sinais em 98,1 e 97,8 ppm como relativos ao C-1 das unidades de α -ácidos urônicos (RENARD *et al.*, 1998). Os sinais em 77,6 e 76,6 ppm foram atribuídos ao C-4 e C-2 substituídos das unidades de α -ácidos urônicos e α -ramnopirranose, respectivamente, que, segundo RENARD

et al. (1998), podem ser referentes a unidades de ácido galacturônico ligadas de forma alternada com unidades de α -ramnopirranose, constituindo uma ramnogalacturonana formada por unidades repetitivas do grupo dissacarídico (1 \rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2) α -L-Rhap.

Pelos dados de metilação apresentados na Tabela 4, pode-se concluir que PK2-hp apresenta unidades de ramnose ligadas por 1 \rightarrow 2 e 1 \rightarrow 2,4, como é demonstrado pela presença dos derivados 3,4-Me₂-Rha (22,0%) e 3-Me-Rha (12,8%), respectivamente, o que, segundo CARPITA e GIBEAUT (1993), é coerente com as unidades de ramnose presentes em ramnogalacturonanas que apresentam cadeias laterais de arabinanas ou arabinogalactanas ligadas no O-4 das unidades de ramnose.

Também pode-se observar a presença dos derivados 2,4,6-Me₃-Gal (4,4%), 2,3,6-Me₃-Gal (19,7%), 2,3,4-Me₃-Gal (14,4%) e 2,4-Me₂-Gal (7,3%), demonstrando as ligações 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6 e 1 \rightarrow 3,6 nas unidades de galactopirranose, respectivamente. As unidades terminais não redutoras representam 19,4% do total de derivados metilados, o que está demonstrado pela presença de 2,3,4,6-Me₄-Gal.

TABELA 4 – ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DA ARABINO GALACTANA HIDROLISADA PARCIALMENTE (PK2-hp).

Derivado	Tipo de Ligação	%
3,4-Me ₂ -Rha	(1 \rightarrow 2)- <i>p</i>	22,0
3-Me-Rha	(1 \rightarrow 2,4)- <i>p</i>	12,8
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	⁽¹⁾ (TNR)- <i>p</i>	19,4
2,4,6-Me ₃ -Gal	(1 \rightarrow 3)- <i>p</i>	4,4
2,3,6-Me ₃ -Gal	(1 \rightarrow 4)- <i>p</i>	19,7
2,3,4-Me ₃ -Gal	(1 \rightarrow 6)- <i>p</i>	14,4
2,4-Me ₂ -Gal	(1 \rightarrow 3,6)- <i>p</i>	7,3

NOTA: (1) Terminal Não Redutor.

4.3.4. Carboxi-Redução de PK2-hp

Pelo fato de PK2-hp apresentar uma alta quantidade de ácido urônico (49%), este polissacarídeo passou pelo processo de carboxi-redução, o qual consiste na redução do ácido urônico em seu açúcar neutro correspondente, com a finalidade de se determinar qual unidade de ácido urônico está presente, bem como estabelecer estudos mais seguros de metilação desse polissacarídeo.

Para isso, foram utilizados 100 mg de material e, após dois ciclos de carboxi-redução, restaram 50 mg de polissacarídeo carboxi-reduzido, que foi chamado de PK2-hpCR. Essa grande perda de material no processo de carboxi-redução, provavelmente, deve-se à diálise do mesmo, conforme descrito nos Materiais e Métodos (item 3.4.6). Uma vez que PK2-hp deve apresentar uma massa molar muito menor que PK2, PK2-hp, após sofrer carboxi-redução, foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 8.000 Da e não de 14.000 Da como é convencional no laboratório.

A eficiência da carboxi-redução foi comprovada pela dosagem de ácidos urônicos de PK2-hpCR, que foi de apenas 3%. Além disso, foi realizada a análise de FT-IR (infravermelho), do material antes e após a carboxi-redução, com a visualização do desaparecimento da banda referente à carbonila do ácido carboxílico em 1732 cm^{-1} (Figura 18). De acordo com SILVERSTEIN *et al.* (1994), as bandas de deformação axial de C=O dos ácidos carboxílicos aparecem na região de $1665 - 1760\text{ cm}^{-1}$.

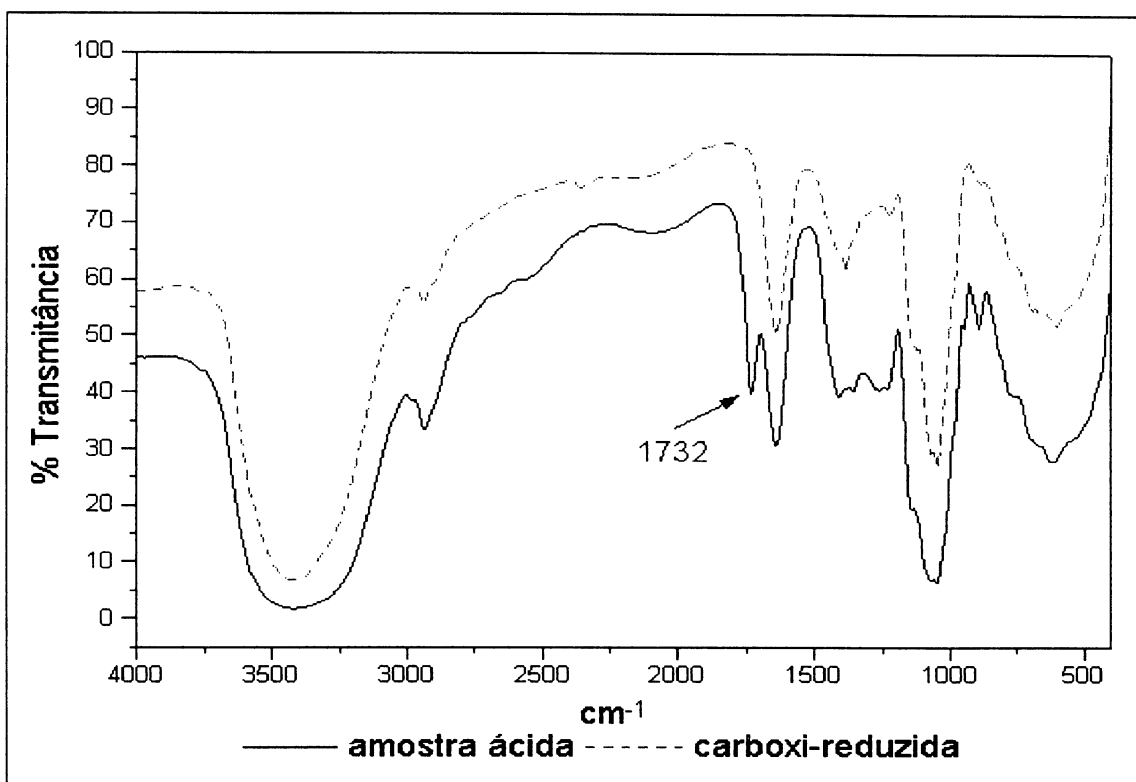


FIGURA 18 - Análise de infravermelho de PK2-hp (amostra ácida) e PK2-hpCR (carboxi-reduzida).

4.3.5. Análise de PK2-hpCR

A análise da composição monossacarídica de PK2-hpCR revelou que este é um polissacarídeo constituído por 22% de ramnose, 75% de galactose e 3% de ácidos urônicos.

Comparando as composições monossacarídicas de PK2-hp e PK2-hpCR, pode-se afirmar que o ácido urônico presente na arabinogalactana (PK2) é o ácido galacturônico. Isso pode ser melhor compreendido analisando a Tabela 5, que apresenta a grande redução na quantidade de ácido urônico da fração PK2-hp (49%) para a fração PK2-hpCR (3%), com concomitante aumento da quantidade de galactose de 34% para 75%.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE PK2, PK2-hp E PK2-hpCR.

Frações	Monossacarídeos (%)			
	Ramnose	Arabinose	Galactose	⁽¹⁾ Ác. urônico
PK2	5,0	69,0	19,5	6,5
PK2-hp	14,0	3,0	34,0	49,0
PK2-hpCR	22,0	-	75,0	3,0

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Dosagem segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

PK2-hpCR foi, então, analisado pela técnica de RMN-¹³C (Figura 19), que indica novamente a eficácia da carboxi-redução, uma vez que o sinal referente ao C-6 do grupamento carboxílico de ácidos urônicos que aparecia em 172,0 ppm no espectro de RMN-¹³C de PK2-hp (Figura 17) desapareceu. A presença de -CH₃ da ramnose é demonstrada com a presença do sinal em 18,0 ppm (GORIN e MAZUREK, 1975).

Não houve grandes alterações na região anomérica de PK2-hp para PK2-hpCR. Os pequenos deslocamentos químicos nos sinais de C-1 devem-se, mais provavelmente, à mudança do solvente de análise (D₂O para Me₂SO-*d*₆, respectivamente), do que à carboxi-redução. Agora, os principais sinais de C-1 aparecem em 105,2 e 103,9 ppm (β-galactopiranoose), 98,8 ppm (α-ramnopiranoose) e 97,7 e 97,3 ppm (α-galactopiranoose proveniente da carboxi-redução do ácido galacturônico).

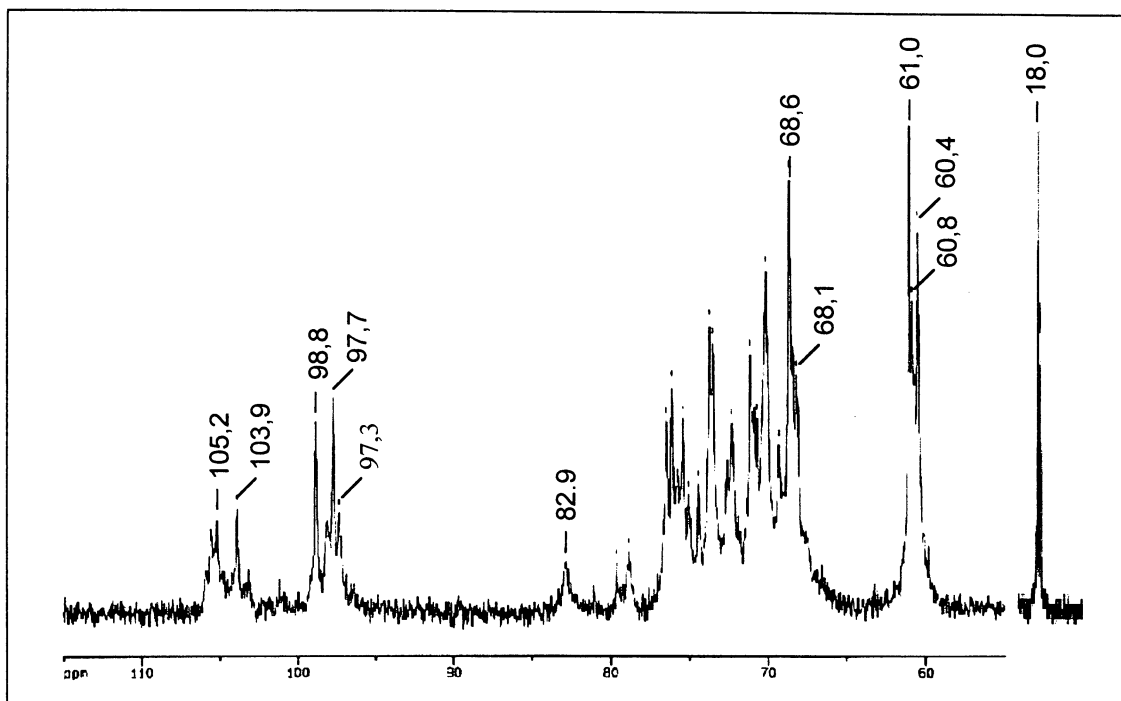


FIGURA 19 - Espectro de RMN- ^{13}C de PK2-hpCR em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.

Pelos dados de metilação apresentados na Tabela 6, pode-se concluir que PK2-hpCR apresenta unidades de ramnose ligadas por $1 \rightarrow 2$ e $1 \rightarrow 2,4$, como é demonstrado pela presença dos derivados 3,4- Me_2 -Rha (15,8%) e 3-Me-Rha (12,5%), respectivamente. Também observou-se a presença dos derivados 2,4,6- Me_3 -Gal (3,1%), 2,3,6- Me_3 -Gal (40,8%), 2,3,4- Me_3 -Gal (9,5%) e 2,4- Me_2 -Gal (5,4%), que demonstram as ligações $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 6$ e $1 \rightarrow 3,6$ nas unidades de galactopirranose, respectivamente. As unidades terminais não redutoras representam 12,9% do total de derivados metilados, o que está demonstrado pela presença de 2,3,4,6- Me_4 -Gal.

TABELA 6 – ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DA ARABINO GALACTANA HIDROLISADA PARCIALMENTE E CARBOXI-REDUZIDA (PK2-hpCR).

Derivado	Tipo de Ligação	%
3,4-Me ₂ -Rha	(1→2)- <i>p</i>	15,8
3-Me-Rha	(1→2,4)- <i>p</i>	12,5
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	⁽¹⁾ (TNR)- <i>p</i>	12,9
2,4,6-Me ₃ -Gal	(1→3)- <i>p</i>	3,1
2,3,6-Me ₃ -Gal	(1→4)- <i>p</i>	40,8
2,3,4-Me ₃ -Gal	(1→6)- <i>p</i>	9,5
2,4-Me ₂ -Gal	(1→3,6)- <i>p</i>	5,4

NOTA: (1) Terminal Não Redutor.

4.3.6. Análise Comparativa de PK2, PK2-hp e PK2-hpCR

Através da comparação dos espectros de RMN-¹³C de PK2, PK2-hp e PK2-hpCR (Figura 20), fica evidente que houve o desaparecimento dos sinais referentes às unidades de arabinose (>106,5 ppm) de PK2, quando este sofreu o processo de hidrólise parcial, dando origem a PK2-hp. Também é claro que não houve grandes alterações nos sinais de RMN-¹³C quando PK2-hp foi carboxi-reduzido dando origem a PK2-hpCR. Porém, é notável um aumento na intensidade dos sinais referentes ao C-6 não ligado na região de 60,4-61,0 ppm, provavelmente porque o sinal de C-6 do grupamento carboxílico dos ácidos galacturônicos da fração PK2-hp, após serem reduzidos à galactose, sofreram deslocamento de 172,0 para 60,4-61,0 ppm.

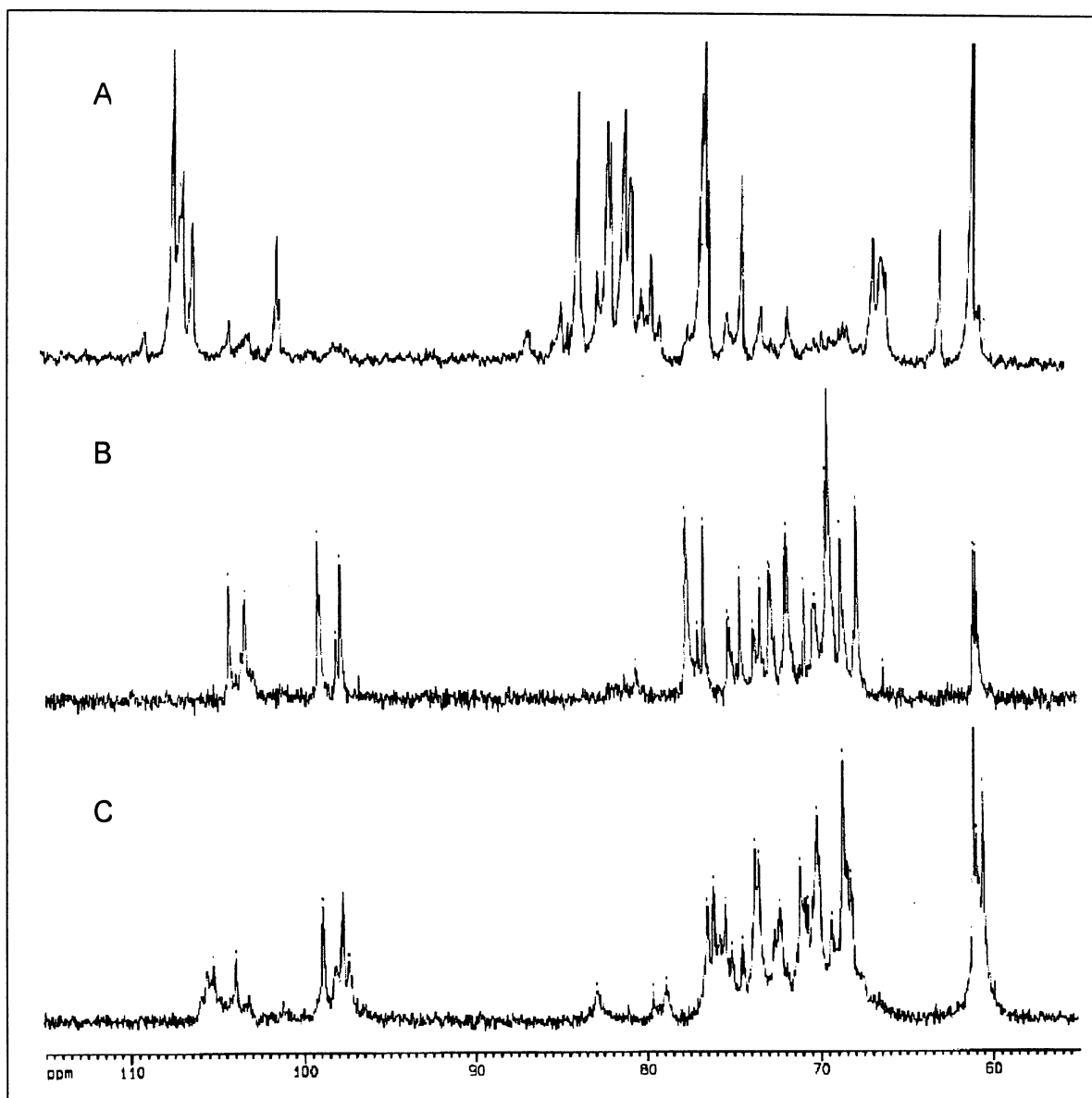


FIGURA 20 - Espectros de RMN-¹³C de PK2 (A), PK2-hp (B) e PK2-hpCR (C). A e B em D₂O e C em Me₂SO-*d*₆.

A análise dos derivados metilados de PK2, PK2-hp e PK2-hpCR juntos (Tabela 7) poderá esclarecer melhor a estrutura da arabinogalactana. As porcentagens relativas dos derivados metilados foram ajustados considerando a presença do ácido galacturônico em cada uma das frações.

TABELA 7 - ANÁLISE POR GC-MS DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS DAS FRAÇÕES PK2, PK2-hp E PK2-hpCR, CONSIDERANDO A PRESENÇA DO ÁCIDO GALACTURÔNICO.

Derivado Metilado	PK2	PK2-hp	PK2-hpCR
2,3,5-Me ₃ -Ara	25,1	-	-
2,5-Me ₂ -Ara	10,0	-	-
2,3-Me ₂ -Ara	19,7	-	-
2-Me-Ara	4,7	-	-
3-Me-Ara	10,8	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	3,0	9,9	12,5
2,4,6-Me ₃ -Gal	⁽²⁾ Tr	2,2	3,0
2,3,6-Me ₃ -Gal	9,6	10,1	39,5
2,3,4-Me ₃ -Gal	1,3	7,3	9,2
2,3-Me ₂ -Gal	2,2	-	-
2,4-Me ₂ -Gal	1,6	3,7	5,2
3,4-Me ₂ -Rha	1,3	11,3	15,4
3-Me-Rha	4,2	6,5	12,2
⁽¹⁾ Ácido Galacturônico	6,5	49,0	3,0

NOTAS: (1) Dosagem segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); (2) Traços; PK2 (arabinogalactana); PK2-hp (arabinogalactana hidrolisada parcialmente); PK2-hpCR (arabinogalactana hidrolisada parcialmente e carboxi-reduzida).

PK2-hp e PK2-hpCR diferem no fato de que o primeiro possui 49% de ácido galacturônico entre os seus carboidratos constituintes e o segundo apenas 3%, isso porque, como já foi demonstrado anteriormente, PK2-hp originou PK2-hpCR após ter sofrido o processo de carboxi-redução. Desse modo, PK2-hpCR também possui uma maior quantidade de galactose (75%), oriunda do ácido galacturônico carboxi-reduzido, que é suscetível à metilação. Isso explica a diferença existente entre essas duas frações nas porcentagens relativas dos seus derivados metilados, como pode ser observado na Tabela 7.

PK2-hpCR apresenta 39,5% do derivado 2,3,6-Me₃-Gal, enquanto PK2-hp possui apenas 10,1%. Isso significa que a diferença dos dois representa o derivado

metilado gerado pela carboxi-redução do ácido galacturônico. Desse modo, 29,4% dos derivados metilados de PK2-hpCR são “2,3,6-Me₃-GalA”, indicando a existência de ligações 1→4 nas unidades de ácido galacturônico.

PK2-hpCR possui também 27,6% de derivados parcialmente metilados de ramnose, que estão divididos em 15,4% de 3,4-Me₂-Rha e 12,2% de 3-Me-Rha, indicando as ligações 1→2 e 1→2,4, respectivamente, nessas unidades de ramnose.

Desso modo, há uma relação aproximada de 1:1 de ramnose (27,6%) e ácido galacturônico (29,4%), que é coerente, segundo CARPITA e GIBEAUT (1993), com a estrutura de ramnogalacturonanas do tipo 1 (RG I), as quais são formadas por unidades repetitivas do grupo dissacarídico (1→4) α -D-GalpA-(1→2) α -L-Rhap. E as unidades de ramnose presentes na estrutura de RG I podem apresentar-se substituídas em O-4 por arabinogalactanas. Essa substituição em O-4 é explicada pela presença de 12,2% do derivado metilado 3-Me-Rha, como já foi citado acima. Assim sendo, a arabinogalactana em estudo parece estar ligada a uma RG I, conforme esquema mostrado na Figura 21.

De acordo com os dados de metilação de PK2 (Tabela 7), a arabinogalactana que está ligada à cadeia RG I parece conter uma estrutura principal constituída por unidades de galactose 1→4 ligadas, indicada pela presença do derivado metilado 2,3,6-Me₃-Gal (9,6%), com pontos de ramificação em O-6, pela presença do derivado metilado 2,3-Me₂-Gal (2,2%), na proporção aproximada de 4:1, respectivamente. Essa ramificação no O-6 da galactose é feita por cadeias laterais de arabinose 1→5 ligadas, pela presença do derivado metilado 2,3-Me₂-Ara (19,7%), com pontos de ramificação em O-2 e O-3, de acordo com os derivados metilados 3-Me-Ara (10,8%) e 2-Me-Ara (4,7%), respectivamente, na proporção aproximada de 4:2:1. Unidades de arabinose 1→3 ligadas também estão presentes, justificadas pela existência do derivado metilado 2,5-Me₂-Ara (10,0%). O esquema provável da cadeia principal da arabinogalactana, ramificada por cadeias de arabinose, pode ser observado na Figura 22.

Como já foi citado anteriormente, PK2 passou pelo processo de hidrólise ácida parcial, fornecendo a fração PK2-hp, o que provavelmente, ocasionou a quebra de muitas estruturas. Por exemplo, foi possível verificar o desaparecimento do derivado metilado 2,3-Me₂-Gal, o que é coerente com a estrutura proposta na

Figura 22, em que a ligação no O-6 da galactose é feita por unidades de arabinose, que são pouco resistentes à hidrólise ácida. Com a clivagem dessa ligação, o derivado que antes era 2,3-Me₂-Gal passa a ser 2,3,6-Me₃-Gal.

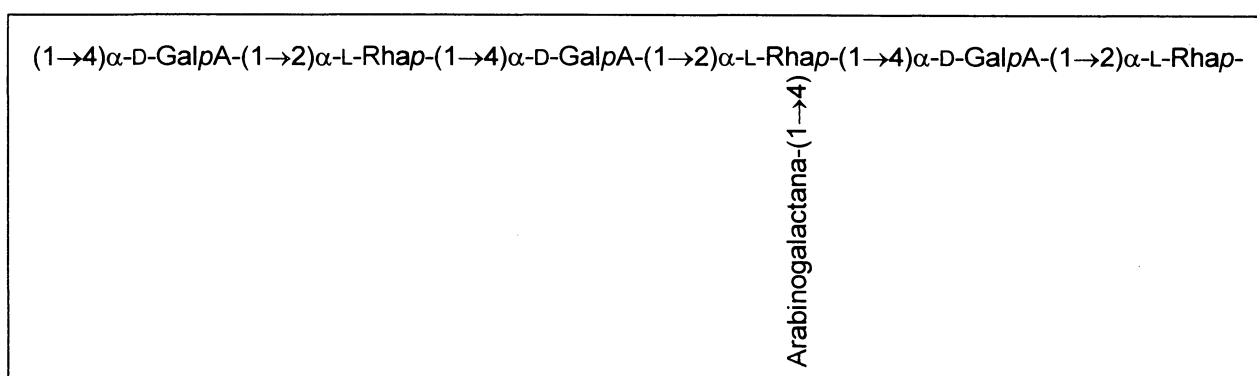


FIGURA 21 – Esquema da provável estrutura da RGI ramificada por cadeias de arabinogalactana.

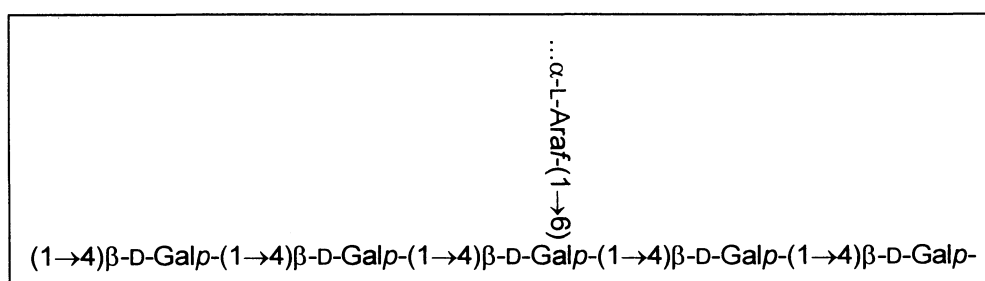


FIGURA 22 – Esquema provável da cadeia principal da arabinogalactana, ramificada por cadeias de arabinose, segundo dados de metilação.

4.3.7. Obtenção de Oligossacarídeos Ácidos de PK2

Uma alíquota (1 g) da fração PK2 foi hidrolisada parcialmente (TFA 0,2 mol/l / 2 horas a 100°C), para a obtenção de PK2-hp, conforme descrito no item 3.4.3. PK2-hp, como já foi demonstrado, consiste de um polissacarídeo contendo um alto teor de ácidos urônicos. Então, este foi hidrolisado parcialmente (TFA 1 mol/l / 3 horas a 100°C), para a obtenção de oligossacarídeos ácidos, conforme descrito no item 3.4.4. O material hidrolisado foi cromatografado em papel e apresentou 3 bandas principais. Com o objetivo de isolamento destas, foi realizada cromatografia preparativa em papel (item 3.6.1.2), com 48 horas de corrida. Foram obtidas 3 bandas, denominadas A ($R_{Lac} = 0,5$), B ($R_{Lac} = 0,7$) e C ($R_{Lac} = 0,9$), com rendimentos de 11, 30 e 39 mg, respectivamente.

As frações A, B e C foram então cromatografadas em papel analítico (item 3.6.1.1), para avaliar os seus graus de pureza, utilizando dois sistemas de solventes (butanol:piridina:H₂O na proporção de 5:3:3 e 1:1:1). Essa análise mostrou que apenas a fração B estava homogênea, apresentando o mesmo deslocamento do padrão de ácido galacturônico. Então, a fração B foi analisada por HPLC (Figura 23A), o qual mostrou que ela era constituída por uma alta quantidade de ácido galacturônico (pico 3), quando comparada com padrão, o que está de acordo com o resultado obtido por cromatografia em papel.

A fração A, por ter um baixo rendimento e apresentar-se heterogênea, não foi estudada. Já a fração C, apesar de heterogênea, apresentou um bom rendimento e foi, então, aplicada novamente em cromatografia em papel preparativa, utilizando um tempo maior de corrida (132 h). Com este procedimento foi possível o isolamento de uma única banda, denominada de C2 ($R_{Lac} = 0,65$), apresentando um rendimento de 6 mg. C2 foi, então, analisada por HPLC (Figura 23B), o qual mostrou que esta era uma fração heterogênea, contendo 3 constituintes principais. Os perfis de eluição obtidos por HPLC das frações B e C2 foram idênticos (Figuras 23A e 23B, respectivamente), porém com porcentagens relativas diferentes (Tabela 8).

A fração C2 foi então hidrolisada com TFA 2 mol/l, a 100°C, por 5 horas (item 3.4.5), e novamente analisada por HPLC (Figura 23C), que mostrou, conforme comparação com padrões, o aparecimento de ácido galacturônico e ramnose (picos 3 e 6 respectivamente), na proporção aproximada de 1:1 (Tabela 8), com a

concomitante diminuição do pico 1. Isso sugere que o pico 1 pode ser um oligossacarídeo ácido constituído por unidades de ácido galacturônico e ramnose. Esse dado reforça a idéia da existência de uma estrutura contendo ácido galacturônico ligado à ramnose constituindo uma RG I, conforme discutido anteriormente no item 4.3.6.

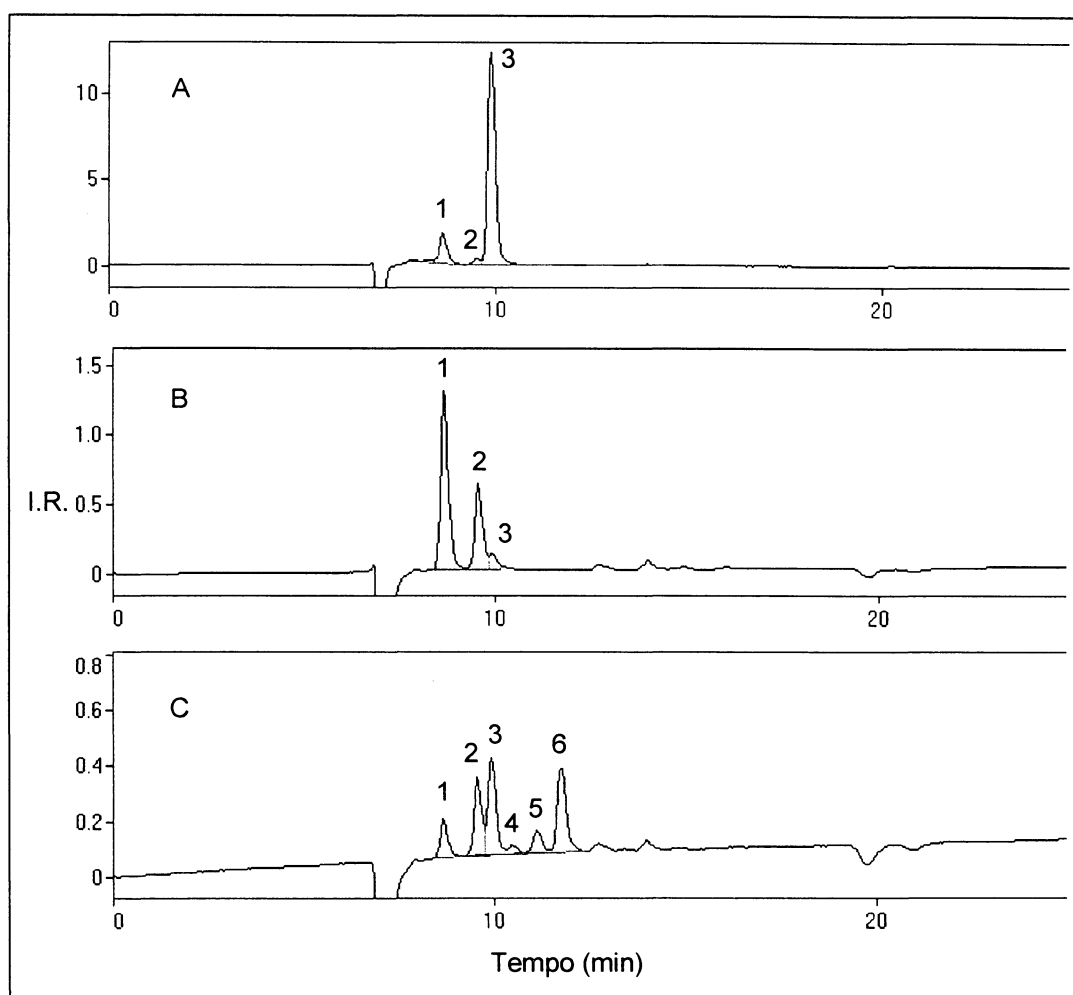


FIGURA 23 – Análise por HPLC das frações B (A), C2 nativa (B) e C2 hidrolisada (C).
 Nota: Fração B – material obtido através de cromatografia em papel preparativa, com $R_{Lac} = 0,7$; C2 nativa – material obtido a partir da fração C, que foi re-cromatografada em papel preparativo, com $R_{Lac} = 0,65$; C2 hidrolisada – C2 nativa hidrolisada com TFA 2 mol/l, a 100°C / 5h. Os picos 3 e 6 apresentam o mesmo tempo de retenção do ácido galacturônico e da ramnose, quando comparados com padrões.

TABELA 8 – TEMPOS DE RETENÇÃO E PORCENTAGENS RELATIVAS DOS CONSTITUINTES OBTIDOS POR HPLC DAS FRAÇÕES B, C2 E C2 HIDROLISADA.

Picos	Frações					
	B		C2		C2 hidrolisada	
	T.R.	%	T.R.	%	T.R.	%
1	8,569	12,2	8,572	62,9	8,575	11,4
2	9,464	2,3	9,465	31,6	9,469	21,8
3	9,836	85,5	9,836	5,5	9,843	28,9
4	-		-	-	10,402	3,2
5	-		-	-	11,047	7,3
6	-		-	-	11,685	27,4

NOTA: T.R. (Tempo de Retenção); Os picos 3 e 6 apresentam o mesmo tempo de retenção do ácido galacturônico e da ramnose, quando comparados com padrões.

4.4. Purificação e Análise da Fração PBK10

A fração PBK10 (3,7 g%), obtida pela extração com KOH10%, passou pelos processos de purificação de congelamento e degelo, e fracionamento pelo método de Fehling, conforme mostrado na Figura 24.

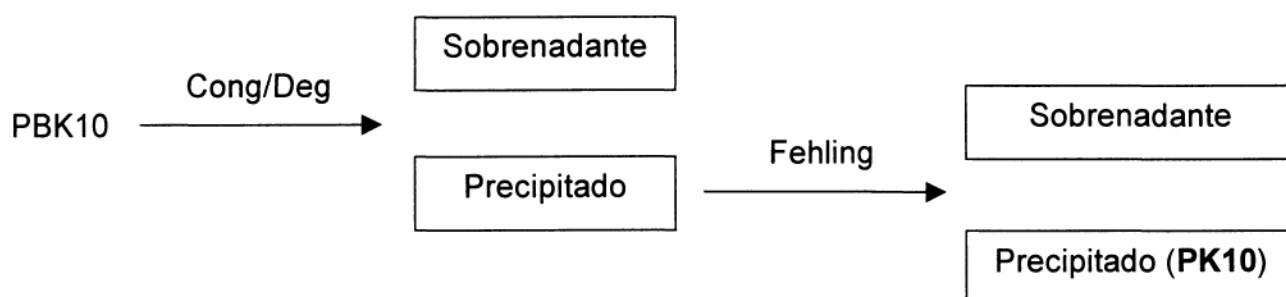


FIGURA 24 – Fluxograma do processo de purificação do polissacarídeo da fração PBK10.

Cada uma das frações obtidas durante as etapas de purificação de PBK10 foi analisada quanto a sua composição monossacarídica (Tabela 9) e, como pode ser verificado, a fração PK10 demonstrou ser um homopolímero composto por unidades de xilose que representa 1,4 g% do peso seco das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

TABELA 9 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO PBK10.

Frações	Rendimento (g%)	Monossacarídeos %					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Sob g/d	1,7	-	16,0	48,0	14,0	22,0	-
Ppt g/d	2,0	-	3,0	90,0	-	3,0	4,0
Sob Feh	0,6	3,8	29,0	7,6	17,0	17,6	25,0
PK10	1,4	-	tr	98,0	-	tr	-

NOTAS: Análise dos alditóis acetatos por GC-MS.

Rha (ramnose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); tr (traços); Sob g/d (fração solúvel após congelamento e degelo); Ppt g/d (fração insolúvel após congelamento e degelo); Sob Feh (fração solúvel na solução de Fehling); PK10 (precipitado na solução de Fehling).

Foi realizado RMN-¹³C de PK10 (Figura 25), o qual mostra claramente a presença de um homopolímero linear constituído por unidades de xilose $\beta(1\rightarrow4)$ ligadas. O espectro apresenta cinco sinais com assinalamentos em 102,3, 76,4, 74,3, 73,1 e 63,4 ppm correspondendo, respectivamente, ao carbono anomérico em beta configuração das unidades de xilopiranoose, C-4, C-3, C-2 e C-5 (BUSATO, 1999; CORDEIRO, 2000; CARBONERO *et al.*, 2002; MELLINGER, 2002).

Pelo espectro de DEPT135 (Figura 26), pode-se evidenciar que o sinal correspondente ao CH₂ aparece invertido e com deslocamento químico em δ 63,4 ppm, o que demonstra não haver substituição em C-5.

Com a finalidade de estabelecer os deslocamentos químicos de ¹H, foi realizada a técnica de RMN bidimensional, HMQC, a qual correlaciona os sinais dos carbonos com os seus respectivos hidrogênios (Figura 27). Desse modo, foi possível assinalar os sinais de H-1 (δ 4,28), H-2 (δ 3,07), H-3 (δ 3,31), H-4 (δ 3,53) e dois sinais de H-5, um com δ 3,91 e o outro com δ 3,20. Os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios podem ser visualizados na Tabela 10.

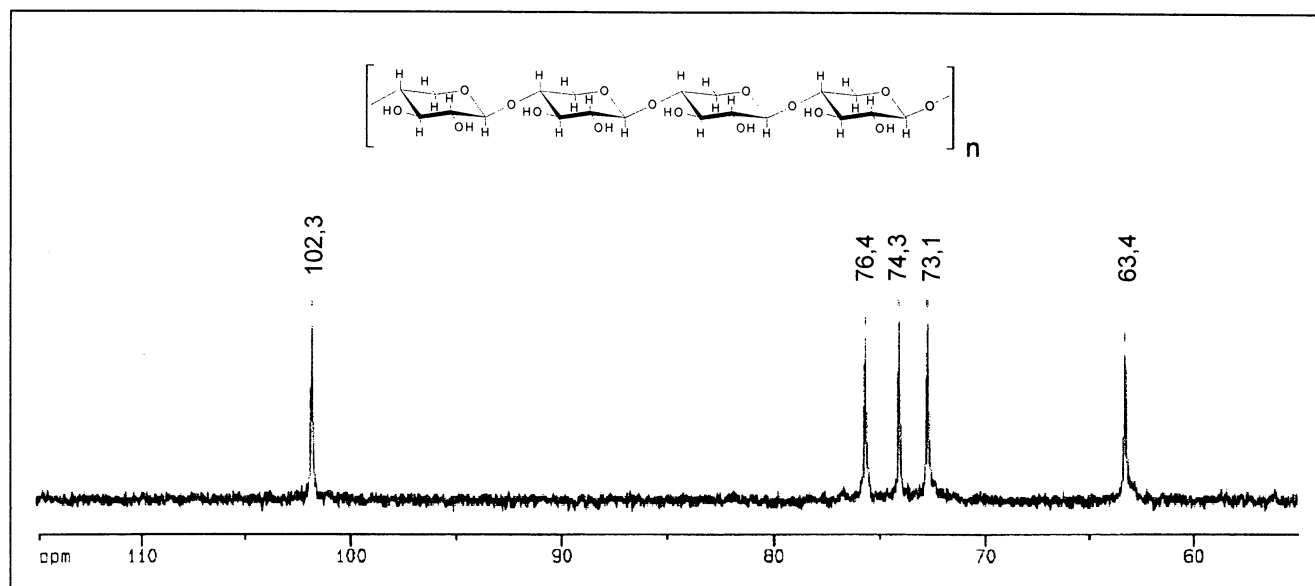


FIGURA 25 – Espectro de RMN- ^{13}C da β -xilana (PK10) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.

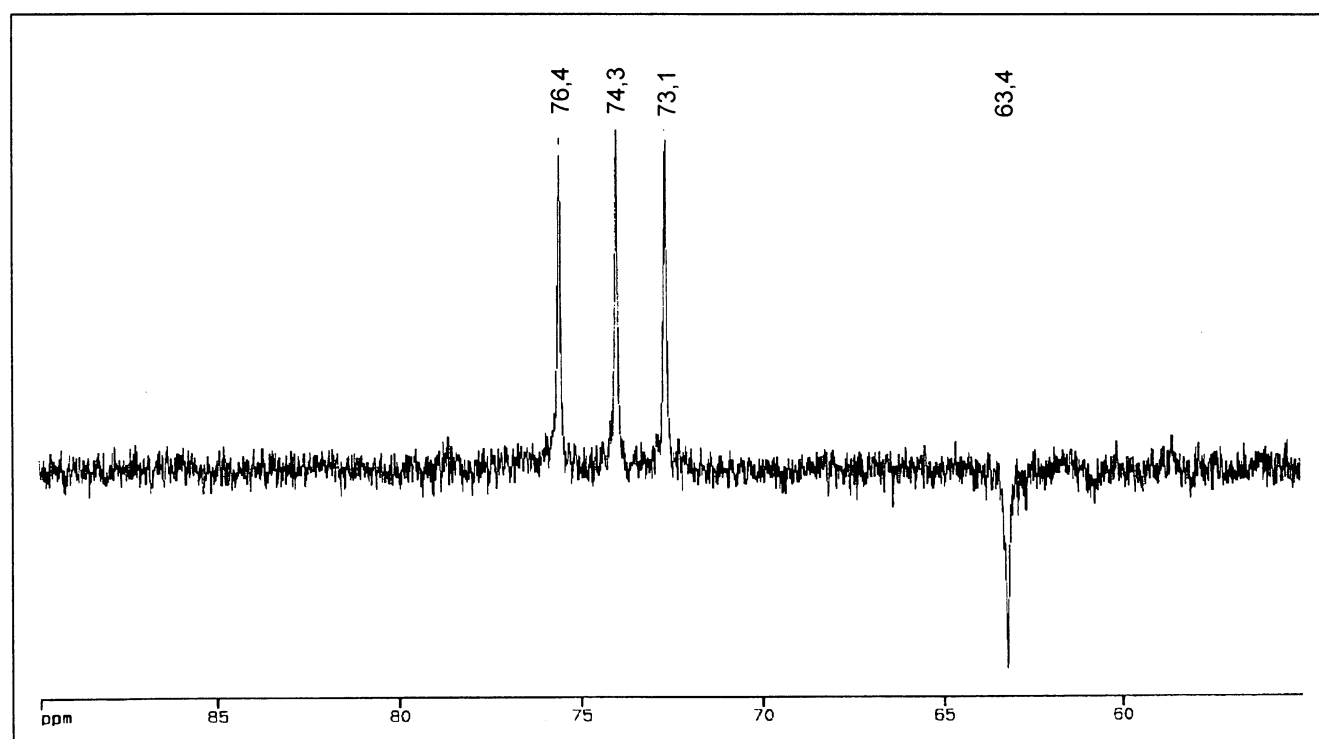


FIGURA 26 – Espectro de DEPT135 da β -xilana (PK10) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.

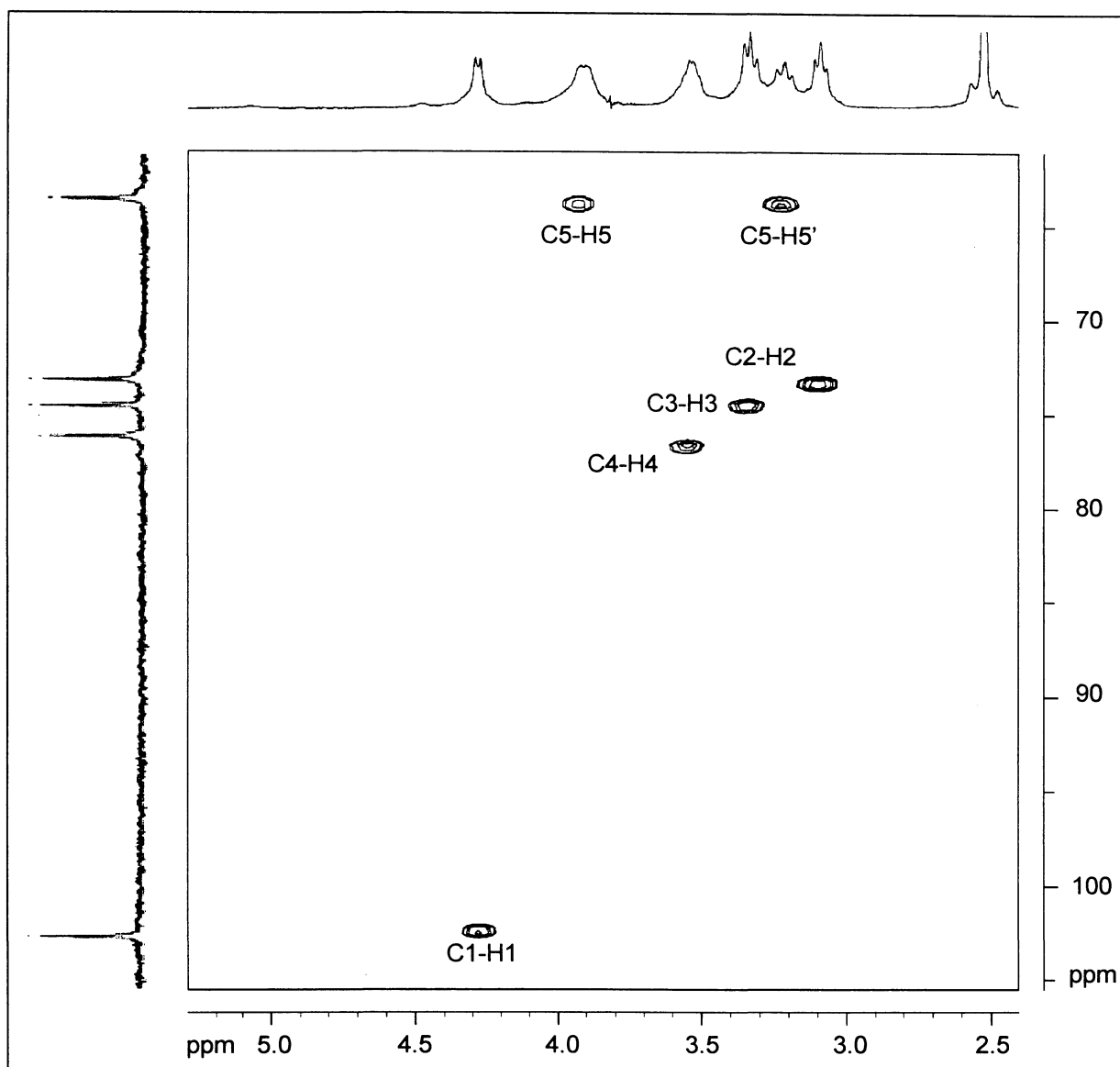


FIGURA 27 – Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da β -xilana (PK10) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m. C1-H1 (correlação entre C-1 e H-1).

TABELA 10 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EM PPM DE RMN- ^{13}C E ^1H OBTIDOS DA β -XILANA A PARTIR DO HMQC.

Unidade de H e C	^1H (δ)	^{13}C (δ)
H1/C1	4,28	102,3
H2/C2	3,07	73,1
H3/C3	3,31	74,3
H4/C4	3,53	76,4
H5/C5	3,91	63,4
H5/C5'	3,20	63,4

A análise de metilação da xilana confirmou a estrutura de um polissacarídeo linear, não ramificado, apresentando apenas dois derivados metilados, sendo 99,5% de 2,3-Me₂-Xyl correspondendo a unidades de xilose 1→4 ligadas e 0,5% de 2,3,4-Me₃-Xyl à extremidade não redutora da molécula. Esses dados estão de acordo com o resultado de RMN- ^{13}C obtido para este polímero (Figura 25).

Como os derivados metilados 2,3-Me₂-Xyl e 3,4-Me₂-Xyl apresentam o mesmo tempo de retenção na coluna DB-225 e o mesmo padrão de fragmentação de massa, a confirmação de que o derivado correto era o 2,3-Me₂-Xyl foi feita utilizando redução com boroidreto de sódio deuterado. Desse modo, os dois derivados acima podem ser diferenciados, pois apresentam um padrão de fragmentação diferenciado, o derivado 2,3-Me₂-Xyl com sinais principais de m/z 118 e 129, e o 3,4-Me₂-Xyl, 117 e 130.

As homoxilanas são raras na natureza, porém, a metodologia empregada na purificação da xilana $\beta(1\rightarrow4)$ linear tem sido eficiente na caracterização deste polissacarídeo, como já descrito por CORDEIRO (2000), CARBONERO *et al.* (2002) e MELLINGER (2002).

4.5. Análise do Infuso

Com o objetivo de verificar se os polissacarídeos da *Maytenus ilicifolia* anteriormente estudados estão presentes no chá que popularmente é preparado, estes foram pesquisados a partir do infuso das folhas trituradas da planta. A partir de 70 g foram obtidos 15 g de extrato, que correspondem a um rendimento de 21 g%.

Para a obtenção dos polissacarídeos, esse extrato foi, então, dialisado, com a finalidade de eliminar os componentes de baixa massa molar. O material que permaneceu no saco de diálise rendeu 1 g. Esse material, constituído por elementos de alta massa molar, passou pelo processo de congelamento e degelo, que originou um precipitado (300 mg) e um sobrenadante (700 mg). O sobrenadante de congelamento e degelo foi utilizado para a pesquisa de polissacarídeos. Essa fração apresentou 32,7% de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956) e 39% de proteínas (PETERSON, 1977 e HARTREE, 1972).

Pelo fato de o sobrenadante de congelamento e degelo ter apresentado uma elevada quantidade de proteínas, ele foi tratado com TCA 5% com a finalidade de precipitá-las. Dessa forma, foram obtidas duas frações: precipitado-TCA 5% (TCAp) e sobrenadante-TCA 5% (TCAs), as quais renderam, respectivamente, 294 e 153 mg.

TCAp apresentou apenas 14,7% de açúcares totais e 67,7% de proteínas, enquanto TCAs apresentou 54,6% de açúcares totais e apenas 2,4% de proteínas. Dessa forma, para a pesquisa de carboidratos foi utilizada apenas a fração TCAs. O rendimento, a determinação de carboidratos e a composição monossacarídica de TCAp e TCAs podem ser visualizadas na Tabela 11 e o esquema de obtenção dessas frações, na Figura 28.

TCAs apresentou uma composição monossacarídica de 7,4% de ramnose, 29,6% de arabinose, 44,1% de galactose, 15,1% de glucose e 3,8% de ácidos urônicos (Tabela 11). Também foi verificado que esta era uma fração heterogênea, composta por pelo menos quatro moléculas, por análise do perfil de eluição em HPSEC-MALLS (Figura 29).

TABELA 11 – RENDIMENTO, DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TCAp E TCAs DO INFUSO DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Frações	Rendimento Bruto (g%)	Proteína (g%)	⁽¹⁾ Açúcar Total (g%)	Monossacarídeos (g%)					
				Rha	Ara	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ác
TCAp	0,42	67,7	14,7	29,0	23,3	5,0	26,6	16,1	0
TCAs	0,22	2,4	54,6	7,4	29,6	-	44,1	15,1	3,8

NOTAS: Análise dos alditóis acetatos por GC-MS. (1) Determinação do açúcar total segundo DUBOIS *et al.* (1956); (2) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Rha (ramnose); Ara (arabinose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác (ác. urônico); TCAp (precipitado em TCA 5%); TCAs (sobrenadante em TCA 5%).

O espectro de RMN-¹³C de TCAs (Figura 30) mostra sinais em 107,5, 109,1 e 109,2 ppm, que correspondem, provavelmente, ao C-1 de unidades de α -arabinofuranose (TISCHER *et al.*, 2002; DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998) e sinais em 103,2 e 103,4 ppm, que correspondem, provavelmente ao C-1 de unidades de β -galactopirranose (TISCHER *et al.*, 2002; DELGOBO *et al.*, 1998; MENESTRINA *et al.*, 1998; GORIN E MAZUREK, 1975).

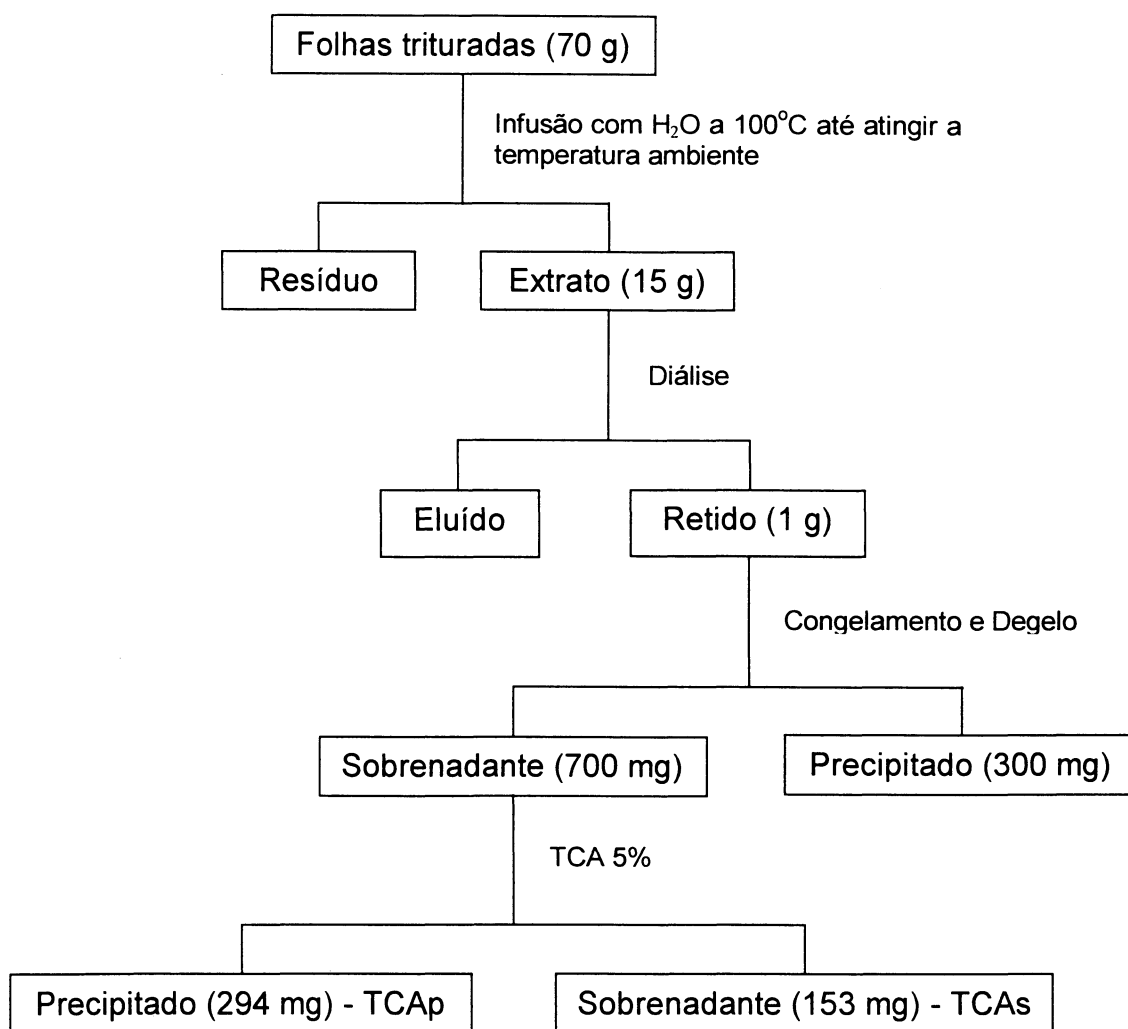


FIGURA 28 – Fluxograma do processo de obtenção dos polissacarídeos do infuso das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

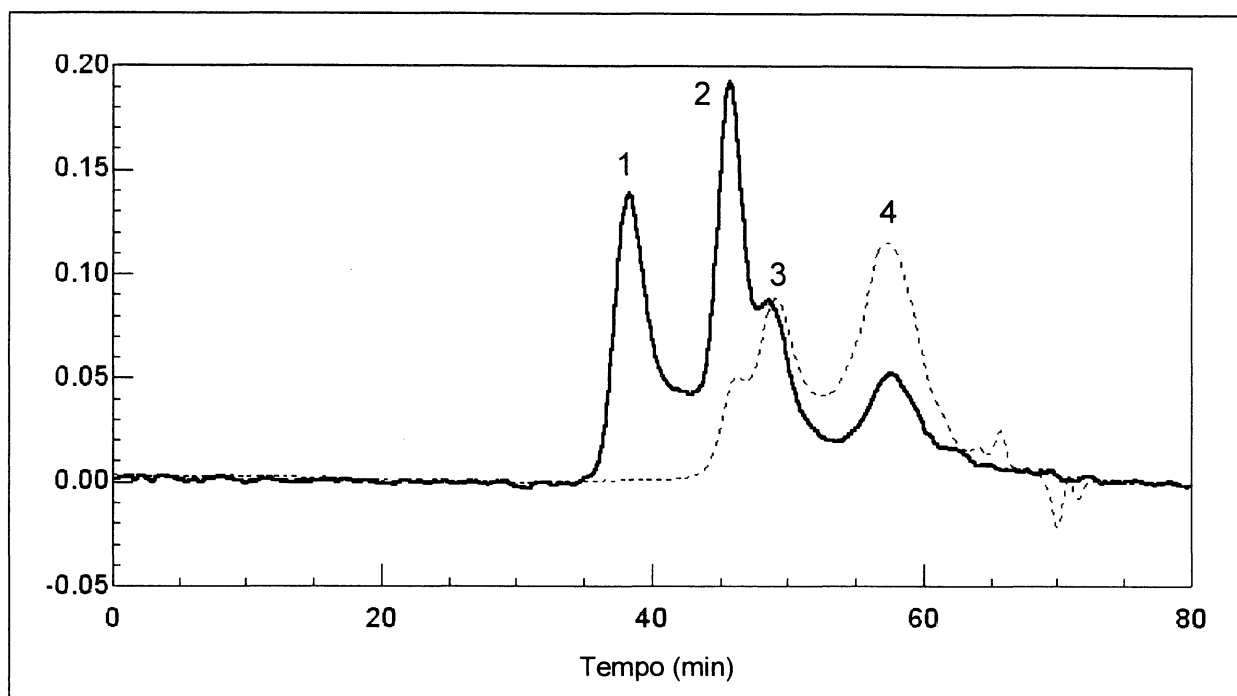


FIGURA 29 – Perfil de eluição de TCAs contendo quatro moléculas distintas (1, 2, 3 e 4), em HPSEC-MALLS.

Nota: A linha inteira representa o espalhamento de luz no detector de 90° e a linha pontilhada, o índice de refração.

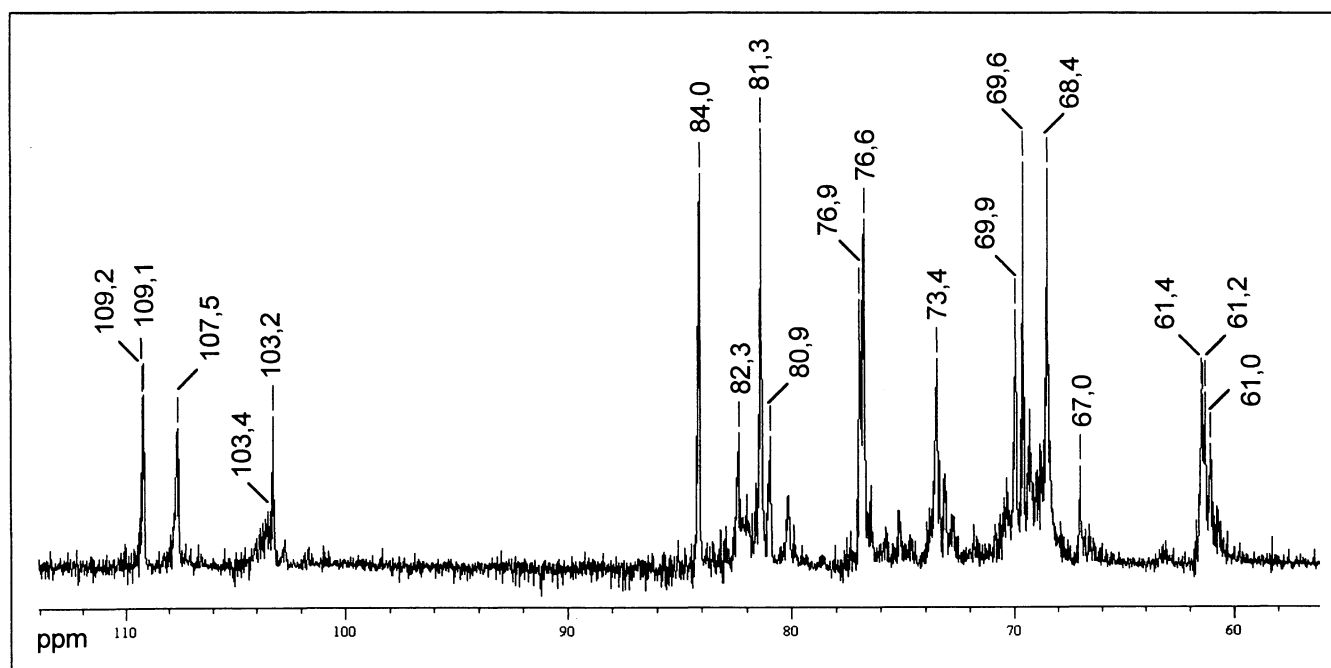


FIGURA 30 - Espectro de RMN-¹³C de TCAs em D₂O, a 50°C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.

Uma análise comparativa entre os espectros de RMN- ^{13}C de TCAs e da arabinogalactana PK2 pode ser verificada na Figura 31. Pelos assinalamentos observados, a arabinogalactana parcialmente caracterizada, isolada a partir da extração com KOH 2%, não está presente entre os polissacarídeos de TCAs, ou está presente em quantidade muito pequena. No entanto, é observado que sinais em 103,2, 107,5 e 109,2 ppm estão presentes em ambos os espectros. Dessa forma, TCAs provavelmente possui polímeros semelhantes a segmentos estruturais da arabinogalactana PK2.

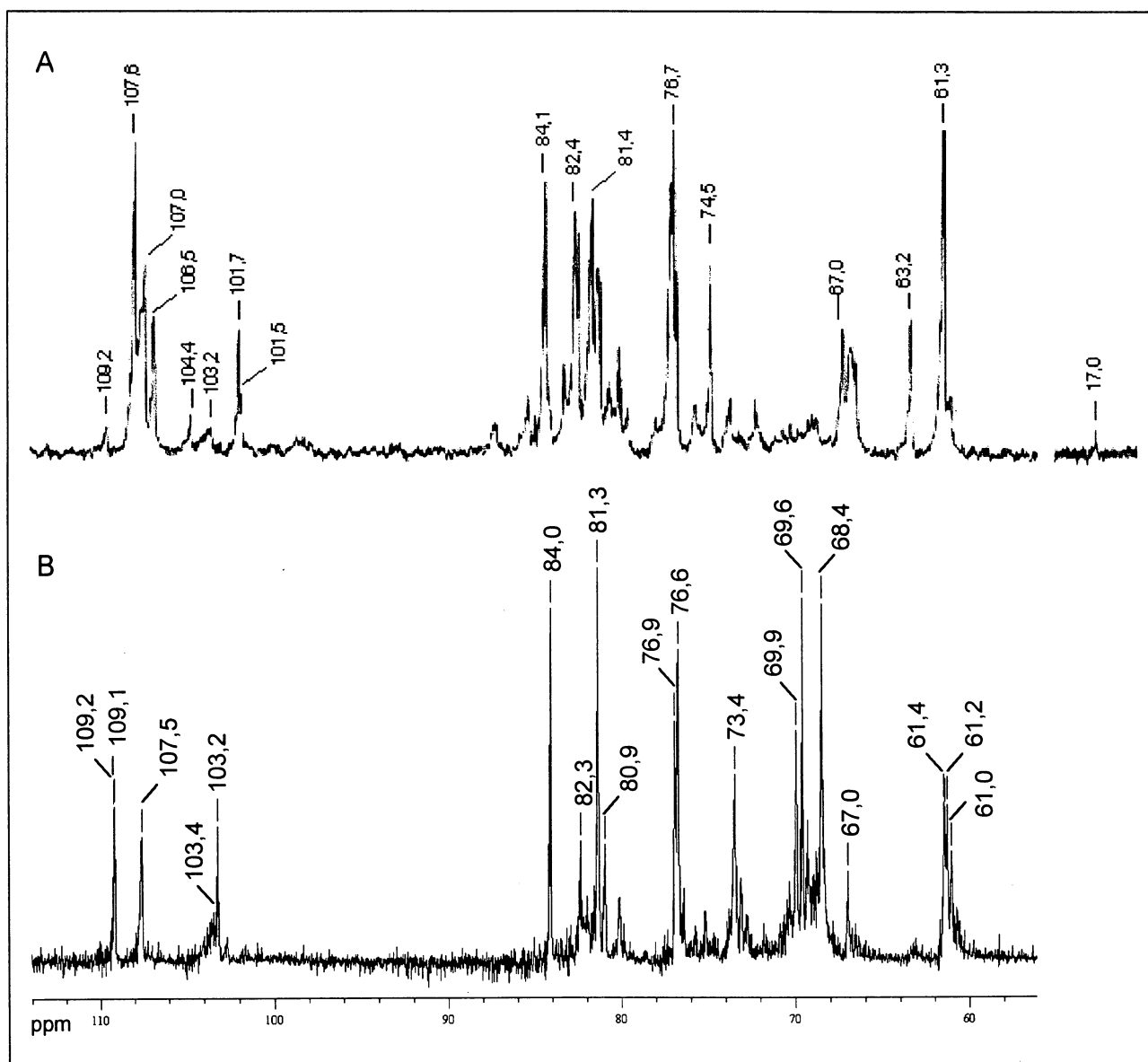


FIGURA 31 – Comparação entre os espectros de RMN- ^{13}C de PK2 (A) e TCAs (B). Ambos em D_2O , a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em p.p.m.

4.6. Análise das Frações EMA e SEEA

As frações EMA e SEEA, respectivamente, extrato metanol-aquoso e sobrenadante etanólico da extração aquosa, são ricas em carboidratos de baixa massa molar.

A análise por GC-MS da composição monossacarídica dessas duas frações pode ser visualizada na Tabela 12.

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EMA E SEEA.

Frações	Monossacarídeos (%)				
	Ram	Ara	Man	Gal	Glu
EMA	4,8	6,7	1,3	77,4	8,4
SEEA	6,3	10,5	1,1	69,5	12,6

NOTA: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS.

Como pode ser verificado na tabela acima, EMA e SEEA assemelham-se muito quanto à composição monossacarídica. Isso já era esperado, uma vez que SEEA representa o que não foi completamente extraído com metanol:água.

Além disso, pode ser verificado que tanto EMA quanto SEEA apresentam uma grande quantidade de galactose, 77,4% e 69,5%, respectivamente, em sua composição monossacarídica. Essa galactose, bem como os demais açúcares constituintes dessas frações, podem fazer parte da estrutura de oligossacarídeos, estarem presentes na forma de monossacarídeos livres ou, até mesmo, na forma de seus álcoois livres correspondentes.

Numa análise inicial, feita por cromatografia em papel, pôde ser verificado que as duas frações, tanto brutas quanto hidrolisadas, apresentavam um perfil cromatográfico muito semelhante (Figura 32) e uma grande quantidade de açúcares livres parecia estar presente. No entanto, entre esses açúcares parecia não haver presença de galactose, através da comparação do perfil migratório com padrões, o que era contrastante com o resultado obtido pelo GC-MS. Logo, ao invés da galactose, poderia haver galactitol na amostra.

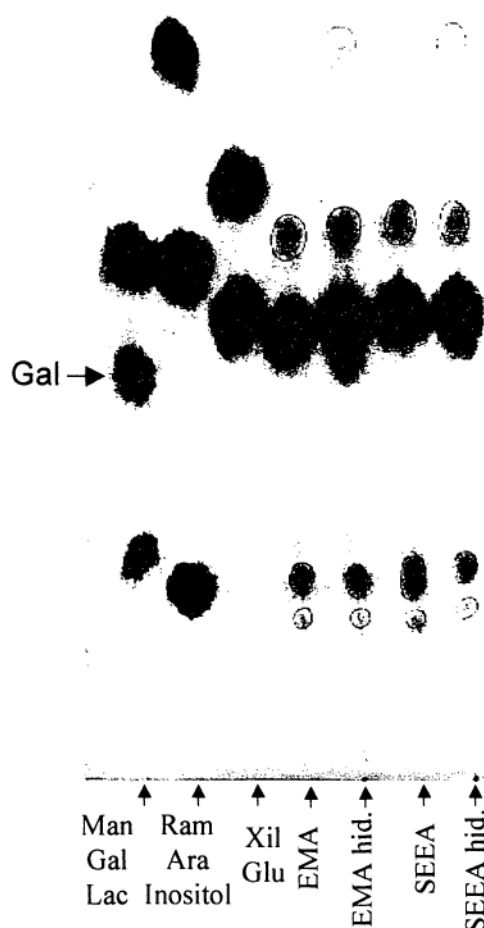


FIGURA 32 – Cromatografia em papel Whatman 1 das frações EMA e SEEA (amostras brutas e hidrolisadas).

Notas: Corrida de 18 h / solvente Butanol:Piridina:H₂O (5:3:3) / revelador nitrato de prata. Padrões (estão alinhados em ordem do maior deslocamento para o menor): Man (manose), Gal (galactose), Lac (lactose); Ram (ramnose), Ara (arabinose), Inositol; Xil (xilose), Glu (glucose). Amostras: EMA (extrato metanol aquoso), EMA hid. (EMA hidrolisado), SEEA (sobrenadante etanólico da extração aquosa), SEEA hid. (SEEA hidrolisado).

A composição de álcoois livres de EMA e SEEA foi então determinada em GC-MS. Para isso, essas frações foram acetiladas, porém sem prévia hidrólise e redução. EMA e SEEA apresentaram, respectivamente, 93,0% e 86,5% do álcool galactitol, 6,5% e 8,5% de arabinitol, e traços de manitol e inositol.

Para avaliar o percentual em massa de álcool livre presente nessas frações, utilizou-se quantificação por GC-MS, em presença do padrão interno de alitol, conforme descrito no item 3.4.1.3.

Os perfis cromatográficos em GC-MS de EMA+alitol e SEEA+alitol podem ser observados na Figura 33.

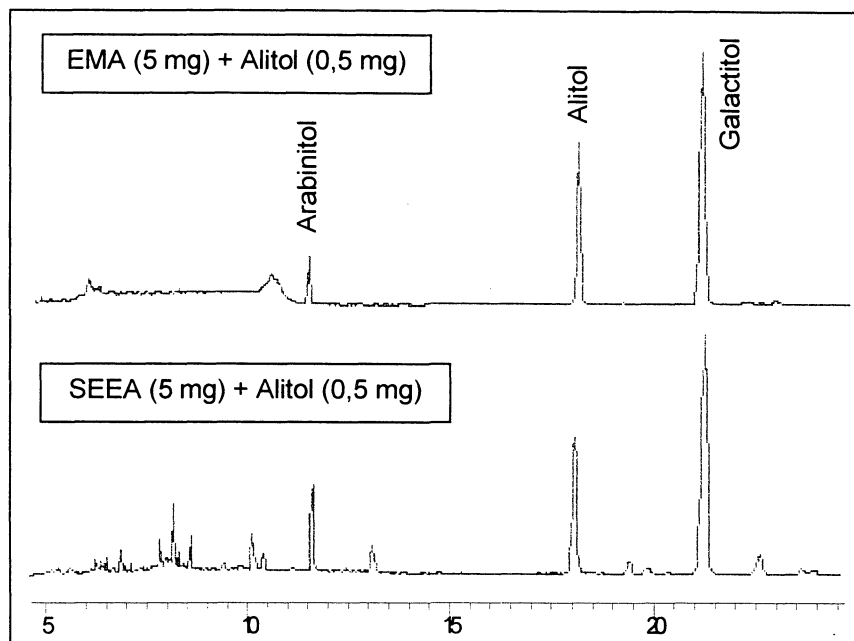


FIGURA 33 – Perfis cromatográficos em GC-MS da quantificação dos alditóis, sem prévia redução, presentes em EMA e SEEA utilizando padrão interno de alitol.

As frações EMA e SEEA apresentaram, respectivamente, 20% e 25% de sua massa em galactitol e 2% e 4% em arabinitol. Uma vez que EMA representa 23 g% e SEEA 1,7 g% do peso das folhas secas da *Maytenus ilicifolia*, isso indica que elas são compostas por aproximadamente 5 g% de galactitol e 0,5 g% de arabinitol.

5. CONCLUSÕES

- Da extração com KOH 2%, foi isolada uma arabinogalactana de estrutura complexa, com massa molar de 87.000 g/mol. Sugeriu-se, através das análises de RMN-¹³C e metilação que esta arabinogalactana apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de β -Galp ligadas (1→4), ramificada com substituintes de Araf em O-6. Estas unidades de Araf são substituídas em O-5, O-3, O-3,5 e O-2,5.
- A arabinogalactana está provavelmente ligada ao O-4 de algumas unidades de Ramp de uma ramnogalacturonana tipo I, formada pela repetição do grupo dissacarídico (1→4) α -D-GalpA-(1→2) α -L-Ramp, freqüentemente observada em pectinas de plantas.
- Uma β -xilana linear com ligações (1→4), foi obtida como precipitado na solução de Fehling, da fração precipitado de congelamento e degelo, do material extraído com KOH 10%. A estrutura foi confirmada pelos derivados metilados 2,3-Me₂-Xil (99,5%) e 2,3,4-Me₃-Xil (0,5%), além dos estudos de RMN-¹³C e ¹H, ¹³C HMQC.
- Foi possível observar a presença de polissacarídeos no infuso das folhas da *Maytenus ilicifolia*, porém os polissacarídeos isolados a partir das extrações com KOH 2% (arabinogalactana) e KOH 10% (xilana) não estão presentes entre eles, ou estão presentes em quantidades muito pequenas.
- A partir dos extratos EMA e SEEA foi possível afirmar que as folhas secas de *Maytenus ilicifolia* apresentam 5,0 g% de galactitol e 0,5 g% de arabinitol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scientific American**, New York, v. 232, p. 81-95, 1975.

ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, p. 429-430, 1959.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 143.

BAUER, W. D.; TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 51, p. 174-187, 1973.

BOUVENG, H. O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates II. Location of the O-acetyl groups in birch xylan. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 15, p. 96-100, 1961.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 194p. 1990.

BUSATO, A. P. **Polissacarídeos de folhas de *Hymenaea courbaril* (jatobá)**. Curitiba, 1999. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN P. A. J.; IACOMINI M. A (1→6)-linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 206, p. 175-178, 2002.

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus sp* (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 21-35.

CARLINI, E. A.; FROCHTENGARTEN, M. L. Toxicologia clínica (fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 67-73.

CARLINI, E. A.; MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; BARBOSA, V. P. Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A.

Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras). Brasília: CEME, 1988. p. 49-66.

CARPITA, N. C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 23, n. 5, p. 1089-1093, 1984.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, 2000. p. 52-108.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – UNICAMP.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CORDEIRO, L. M. **Caracterização estrutural de polissacarídeos extraídos do fotobionte isolado do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 2000. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DAS, N. N.; DAS, S. C.; DUTT, A. S.; ROY, A. Lignin-xylan ester linkage in jute fiber. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 94, p. 73-82, 1981.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 47, n. 7, p. 1207-1214, 1998.

DEY, P.M.; BROWNLEADER, M.D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 6-9.

DONG, Q.; FANG, J. Structural elucidation of a new arabinogalactan from the leaves of *Nerium indicum*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 332, p. 109-114, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EZAKI, N.; KATO, M.; TAKIZAWA, N.; MORIMOTO, S.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus. IV: Effects of condensed

tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. **Planta Medica**, v. 51, p. 34-38, 1985.

FALEIROS, I. C. F.; SANTOS, D. S.; HARA, C. M.; PEREIRA, A. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; FRANÇA, S. C. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1992. Resumo 042.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto (Califórnia), v. 34, p. 47-70, 1983.

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 328, p. 539-547, 2000.

GEOCZE, S.; VILELA, M. P.; CHAVES, B. D. R.; FERRARI, A. P.; CARLINI, E. A. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 75-87.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. p. 665.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GREGORY, A. C. E.; O'CONNELL, A. P.; BOLWELL, G. P. Xylans. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 15, p. 439-455, 1998.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenos from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, 1991.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: VISSER, J.; BELDEMAN, G.; SOMEREN, K. M. A.; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 1-15.

KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiology**, Washington, v. 51, p. 188-196, 1973.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 189, p. 261-272, 1989.

KOMALAVILAS, P.; ZHU, J. K.; NOTHNAGEL, E. A. Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 15956-15965, 1991.

LAU, J. M.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 137, p. 111-125, 1985.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S.; SILVEIRA FILHO, N. G.; CARLINI, E. A. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum sp.*), folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 5-20.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto (Califórnia), v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos da planta *Phyllanthus niruri* Linn.** Curitiba, 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 47, n. 5, p. 715-721, 1998.

OLIVEIRA, A. G.; ZHAO-HUA, W.; GONTIJO, C.; RÉCIO, R. A.; ALMEIDA, V. L.; FERREIRA, P. M.; VIEIRA, M. A. R. Efeito de substâncias isoladas do extrato aquoso das folhas de *Maytenus ilicifolia* M. (espinheira-santa) sobre a secreção gástrica de ácido. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1992. Resumo 055.

OLIVEIRA, M. G. M.; CARLINI, E. A. Efeitos farmacológicos da administração aguda da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 37-48.

OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; ÁVILA, A. S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; CARDOSO, V. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; BERNARDO-FILHO, M. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **Journal of Ethnopharmacology**, Kidlington, v. 72, p. 179-184, 2000.

OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Kidlington, v. 34, p. 29-41, 1991.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 83, p. 346-356, 1977.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

REICHER, F.; CORREA, J. B. C.; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetyl groups migration. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 135, p. 129-140, 1984.

REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S.; RECHIA, C. V. G.; SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J. Uneven O-acetyl distribution in a lightly acetylated D-xylan from sugar cane. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 283-285, 1994.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 305, p. 271-280, 1998.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 411-490.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products (Lloydia)**, Downers Grove, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 107-108.

SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Kidlington, v. 34, p. 21-27, 1991.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 97-193.

SUN, R. C.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J.; GENG, Z. C.; LIU, J. C. Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 44, p. 29-39, 2001.

TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology**, Washington, v. 51, p. 158-173, 1973.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, Washington, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 47, p. 151-158, 2002.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, London, v. 166, n. 4219, p. 444-445, 1950.

UEMG. Centro de Pesquisa (CEPE). **Espinheira Santa**. Disponível em: <<http://www.lavras.br/cepe/fotos/espinheira%20santa.htm>> Acesso em 23 out. 2001.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 231-239, 1989.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 47, n. 2, p. 265-268, 1998.